

TESIS DE DOCTORADO

ESTUDIO COMPARATIVO DE BIOCERÁMICAS DE FOSFATO CÁLCICO PARA REGENERACIÓN ÓSEA: EFECTOS DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA Y DE LA MICRO Y NANOPOROSIDAD

Iria Gasamáns García

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA DE MATERIALES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019



D. Francisco Guitián Rivera, Profesor Titular del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la USC y Director del Instituto de Cerámica de Galicia, y

D. Arturo Martínez Ínsua, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la USC e investigador de dicho Instituto

CERTIFICAMOS:

Que la presente tesis **“ESTUDIO COMPARATIVO DE BIOCERÁMICAS DE FOSFATO CÁLCICO PARA REGENERACIÓN ÓSEA: EFECTOS DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA Y DE LA MICRO Y NANOPOROSIDAD”** corresponde al trabajo realizado por Dña. Iria Gasamáns García, en el Instituto de Cerámica, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que cumple con los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurrimos en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, a 24 de Abril de 2019.

Fdo.: Francisco Guitián Rivera

Fdo.: Arturo Martínez Ínsua





DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

ESTUDIO COMPARATIVO DE BIOCERÁMICAS DE FOSFATO CÁLCICO PARA REGENERACIÓN ÓSEA: EFECTOS DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA Y DE LA MICRO Y NANOPOROSIDAD

Dna. Iria Gasamáns García;

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento ajustado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mi para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, a 24 de Abril de 2019

Fdo: Iria Gasamáns García.



AGRADECIMIENTOS

Aunque los agradecimientos de este trabajo se presenten previos al mismo, han sido escritos tras su finalización. En la reflexión acerca de las personas que han intervenido en la realización de esta tesis, tanto directa como indirectamente, he sido consciente de que, durante el período que se ha prolongado este trabajo, han sido muchas. Es imposible nombrar a toda la gente que me ha ayudado para poder materializar esta tesis, por lo que me disculpo de antemano de todos aquellos que no figuren a continuación y, seguramente, deberían hacerlo. Me gustaría agradecer su imprescindible participación en este trabajo:

Al Prof. Dr. Francisco Guitián, “Kiko”, por abrirme las puertas del Instituto de Cerámica de Galicia y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y apoyo. También por su optimismo en los momentos de mayor desesperación.

Al Prof. Dr. Arturo Martínez Ínsua, por sus enseñanzas y su formación; imprescindibles para la realización de este trabajo, pero también útiles para el ejercicio de nuestra profesión y para el entendimiento de la vida en general.

A la Dra. Mónica G. Boado, por enseñarme tanto sobre química y materiales, y por mostrarme cómo llevar el método científico durante todas las etapas de este trabajo, y extrapolarlo a diversos ámbitos de la vida.

Al resto del equipo que compone el Instituto de Cerámica de Galicia. A Mar por sus bonitas láminas delgadas. A Rubén y Alfredo por la ayuda con la puesta a punto y funcionamiento de los diversos equipos. Y a los demás miembros por su paciencia y los buenos momentos compartidos, porque de cualquier conversación con ellos se aprende algo.

A mis compañeros doctorandos; Adrián, David y Fidel, por los ánimos y momentos de distensión cuando el desánimo se presentaba, por su ayuda en los diferentes ensayos y, sobre todo, por su amistad.

A mi compañera de box, Marta Porta, porque sin su decisión no me hubiese introducido en esta aventura que tanto ha significado para mí.

A mis amigas y amigos, por entender todos los momentos en que dediqué mi tiempo a este trabajo en lugar de a su compañía, mostrándome su cariño y ánimo.

A los jefes que he tenido que me han posibilitado dedicarle tiempo a este proyecto en los momentos que la consulta lo permitía.

Y, por último, muy especialmente, a mi familia. A mi padre Alfonso, a mi tío Pepe, a mi hermano Alexandro y, sobre todo, a mi madre y abuela, Carmen y María. Porque de ellos he aprendido mucho; y gracias a su ayuda he podido alcanzar muchas metas que me he propuesto y, en concreto, esta tesis doctoral. Ellos han sido los que más han sufrido lo que una tesis supone. Gracias por vuestro apoyo incondicional en todas y cada una de mis decisiones.





1- INTRODUCCIÓN	1
1.1- CENTRO Y GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN EL QUE SE REALIZA LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	3
1.2- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	3
1.3- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
1.3.1- EL TEJIDO ÓSEO	10
1.3.1.1- Definición y Funciones	10
1.3.1.2- Clasificación Macroscópica de los Huesos.....	11
1.3.1.3- Descripción Histológica del Tejido Óseo	13
1.3.1.4- Clasificación Microscópica de los Huesos	17
1.3.1.5- Procesos de Formación Ósea	20
1.3.1.6- Remodelación Ósea	21
1.3.1.7- Homeostasis de Calcio y Fosfato	24

<i>1.3.1.8- Propiedades Mecánicas del Hueso</i>	<i>26</i>
<i>1.3.2- REGENERACIÓN ÓSEA</i>	<i>32</i>
<i>1.3.2.1- Descripción y Conceptos clave en Regeneración Ósea</i>	<i>32</i>
<i>1.3.2.2- Reacciones biológicas Patológicas en la Regeneración Ósea con Biomateriales</i>	<i>35</i>
<i>1.3.2.3- Regeneración Ósea en Cirugía Oral</i>	<i>37</i>
<u><i>1.3.2.3.1- Regeneración Tisular Guiada (RTG) y Regeneración Ósea Guiada (ROG)</i></u>	<i>39</i>
<u><i>1.3.2.3.2- Biología de la Reparación Ósea en Regeneración Ósea Guiada</i></u>	<i>40</i>
<i>1.3.2.4- Estrategias de futuro para mejorar la regeneración ósea (Ingeniería Tisular)</i>	<i>42</i>
<i>1.3.3- INTRODUCCIÓN A LOS BIOMATERIALES</i>	<i>48</i>
<i>1.3.3.1- Injertos y Sustitutos Óseos</i>	<i>55</i>
<u><i>1.3.3.1.1- Injertos óseos</i></u>	<i>55</i>

1.3.3.1.2- Sustitutos Óseos	58
1.3.3.2- Biomateriales en Regeneración Ósea Guiada	66
1.3.3.2.1- Membranas barrera	66
1.3.3.2.2- Materiales de relleno óseo	69
1.3.3.2.2.1- Autoinjertos en ROG	70
1.3.3.2.2.2- Aloinjertos en ROG	72
1.3.3.2.2.3- Sustitutos Óseos en ROG	74
1.3.4- LA HIDROXIAPATITA Y EL FOSFATO TRICÁLCICO COMO SUSTITUTOS ÓSEOS EN CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL	76
1.3.4.1- La Hidroxiapatita (HA)	76
1.3.4.2- El fosfato tricálcico (TCP)	84
1.3.4.3- Estudios comparativos sobre la eficacia de la Hidroxiapatita y el Fosfato Tricálcico en la formación de hueso	93

1.3.5- INFLUENCIA DE LA MACROPOROSIDAD, MICROPOROSIDAD Y ESTRUCTURA DE SUPERFICIE DE LAS BIOCERÁMICAS EN LA FORMACIÓN DE HUESO	98
1.3.6- NORMATIVA SOBRE LA HOMOLOGACIÓN DEL β-FOSFATO TRICÁLCICO Y LA HIDROXIAPATITA COMO SUSTITUOS ÓSEO	106
1.4- OBJETIVOS	109
2- MATERIAL Y MÉTODOS	111
2.1- MATERIALES	113
2.1.1- CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES COMERCIALES	113
2.1.1.1- Hidroxiapatita (Bio-Oss®)	113
2.1.1.1.1- <u>Difracción de Rayos X</u>	114
2.1.1.1.2- <u>Superficie específica y Porosimetría</u>	115
2.1.1.1.3- <u>Microscopía</u>	116

2.1.1.2- β -Fosfato tricálcico (KeraOs®)	118
2.1.1.2.1- Difracción de Rayos X	118
2.1.1.2.2- Superficie específica y Porosimetría	119
2.1.1.2.3- Microscopía	121
2.1.2- SÍNTESIS DE LOS POLVOS DE HIDROXIAPATITA Y β-FOSFATO TRICÁLCICO DE ELEVADA PUREZA	122
2.1.2.1- Hidroxiapatita	122
2.1.2.2- β -fosfato tricálcico	125
2.2- MÉTODOS	129
2.2.1- TÉCNICAS ANALÍTICAS	129
2.2.1.1- Difracción de Rayos X	129
2.2.1.2- Medida de pH	132
2.2.1.3- Clasificación granulométrica vía húmeda	133

2.2.1.4- Medición de la Densidad Real	136
2.2.1.5- Medición de la Densidad Aparente	138
<u>2.2.1.5.1- Método de Arquímedes</u>	138
<u>2.2.1.5.2- Geopyc</u>	138
2.2.1.6- Porosimetría de mercurio	139
2.2.1.7- Medición de la superficie específica ...	143
2.2.1.8- Microscopía electrónica de barrido	145
2.2.1.9- Microscopía óptica	147
2.2.2- MÉTODOS DE PROCESAMIENTO	150
2.2.2.1- Molienda	150
2.2.2.2- Prensado isostático en frío	151
2.2.2.3- Método de replicación de esponja	152
2.2.2.4- Calcinado y sinterización	153

2.2.3- EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	157
2.2.3.1- Animales	157
2.2.3.2- Protocolo quirúrgico	158
2.2.3.3- Defunción de los animales	161
2.2.4- PREPARACIÓN DE LÁMINAS DELGADAS	162
2.2.5- ESTUDIO HISTOLÓGICO E HISTOMORFOMÉTRICO	169
2.2.5.1- Análisis de los datos	170
3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	173
3.1- FRABRICACIÓN DEL GRANULADO EMPLEADO COMO SUSTITUTO ÓSEO	175
3.1.1- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO DENSO	175
3.1.1.1- Hidroxiapatita	175
<u>3.1.1.1.1- Influencia de la temperatura y tiempo de sinterización en la densificación de HA</u>	<u>175</u>

<u>3.1.1.1.2- Métodos de procesamiento citados en la literatura para incrementar la densificación de HA</u>	179
<u>3.1.1.1.3- Método de obtención de HA de elevada densidad en la presente tesis doctoral</u>	182
3.1.1.1.3.1- Influencia de la temperatura de calcinación del polvo de HA en la estructura	184
3.1.1.1.3.2- Influencia de la temperatura de calcinación en el diámetro medio y en la superficie específica del polvo de HA	185
3.1.1.1.3.3- Fabricación del granulado denso de HA	189
<i>3.1.1.2- β-fosfato tricálcico</i>	195
<u>3.1.1.2.1- Influencia de la temperatura y tiempo de sinterización en la densificación del β-TCP</u>	195
<u>3.1.1.2.2- Métodos de procesamiento citados en la literatura para incrementar la densificación del β-TCP</u>	199
<u>3.1.1.2.3- Método de obtención de β-TCP de elevada densidad en la presente tesis doctoral</u>	203

3.1.1.2.3.1- Influencia de la temperatura de calcinación del polvo de β -TCP en la estructura y densidad real	205
3.1.1.2.3.2- Influencia de la temperatura de calcinación en el diámetro medio y en la superficie específica del polvo de β -TCP	205
3.1.1.2.3.3- Fabricación del granulado denso de β -TCP	211
3.1.2- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO POROSO	219
3.1.2.1- Métodos procesamiento citados en la literatura para confeccionar estructuras porosas de HA y β -TCP	219
3.1.2.2- Fabricación del granulado poroso de HA	222
3.1.2.3- Fabricación del granulado poroso de β -TCP	230
3.2- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS RADIOLÓGICO E HISTOLÓGICO.....	239
3.2.1- HALLAZGOS RADIOLÓGICOS	239

3.2.2- HALLAZGOS HISTOLÓGICOS CUALITATIVOS	241
3.2.2.1- Control	241
3.2.2.2- Biomateriales comerciales	243
<u>3.2.2.2.1- Bio-Oss®</u>	243
<u>3.2.2.2.2- KeraOs®</u>	245
3.2.2.3- Biomateriales densos	248
<u>3.2.2.3.1- Granulado denso de HA</u>	248
<u>3.2.2.3.2- Granulado denso de β-TCP</u>	252
3.2.2.4- Biomateriales porosos	255
<u>3.2.2.4.1- Granulado poroso de HA</u>	255
<u>3.2.2.4.2- Granulado poroso de β-TCP</u>	260
3.2.3- HALLAZGOS HISTOLÓGICOS CUANTITATIVOS	260

3.2.3.1- <i>Análisis de la fiabilidad intraobservador</i>	265
3.2.3.2- <i>Verificación de la Distribución Normal y de la Homogeneidad de las Varianzas de las muestras</i>	265
3.2.3.3- <i>Análisis de la Varianza</i>	266
<u>3.2.3.2.1- Influencia de la composición química</u>	266
3.2.3.2.1.1- Granulado denso	267
a. Hueso formado	267
b. Material remanente	269
3.2.3.2.1.2- Granulado poroso	271
a. Hueso formado	271
b. Material remanente	274
3.2.3.2.1.3- Granulado comercial	277
a. Hueso formado	277

b. Material remanente	279
<u>3.2.3.2.2- Influencia de la porosidad y de la superficie específica</u>	281
3.2.3.2.2.1- Hidroxiapatita	281
a. Hueso formado	281
b. Material remanente	286
3.2.3.2.2.2- β -fosfato tricálcico	288
a. Hueso formado	288
b. Material remanente	292
3.2.3.4- <i>Análisis de correlación simple</i>	296
<u>3.2.3.4.1- Hidroxiapatita</u>	296
<u>3.2.3.4.2- β-fosfato tricálcico</u>	298
4- RESUMEN Y CONCLUSIONES	301

4.1- RESUMEN	303
4.2- CONCLUSIONES	311
5- BIBLIOGRAFÍA	315
6- BIBLIOGRAFÍA GENERADA	371





A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, sans-serif font, with the words 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE' in a smaller, sans-serif font below it.

INTRODUCCIÓN



1- INTRODUCCIÓN

1.1- CENTRO Y GRUPO DE INVESTIGACIÓN

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Instituto de Cerámica de Galicia (ICG). Este instituto mixto fue fundado en el 1990 a partir de un convenio entre la Universidad de Santiago de Compostela y la Asociación para el Fomento de la Investigación Cerámica en Galicia (AFICEGA). Inicialmente, actuaba como centro de investigación y tecnológico de la Industria Cerámica de Galicia, pero enseguida fue diversificando la colaboración con industrias en distintos campos.

En la actualidad, acumula una dilatada experiencia colaborando con más de 150 empresas de diversa índole. Entre ellas figuran INDITEX S.A., GRUPO FERROATLÁNTICA, ENDESA, PESCANOVA ALIMENTACIÓN S.A., GRUPO FINSA y PASEK ESPAÑA S.A. Por otra parte, se trata de un centro de referencia a nivel estatal en la preparación de láminas delgadas para el análisis histológico de tejidos duros.

Entre las diversas líneas de investigación en las que trabaja el ICG destacan los biomateriales, campo en el que el Instituto trabaja desde hace casi 30 años. Entre los resultados obtenidos en dicho ámbito pueden citarse:

- 10 tesis doctorales.
- 60 publicaciones en el CSI.
- 5 patentes de explotación.
- 1 empresa “Spin-off”.

Como ya se ha mencionado, las investigaciones llevadas a cabo en el campo de las biocerámicas dieron lugar a la creación, en el año 1999, de KERAMAT S.L., “Spin-off” del ICG entre otras, como son INDEBAR S.L. o NEOKER S.L. La actividad principal de la empresa KERAMAT S.L. es la producción y comercialización de biocerámicas

para su empleo en diferentes disciplinas de Ciencias de la Salud como la Odontología, Traumatología, Neurocirugía y Veterinaria. Se trata de la única empresa española fabricante de biocerámicas y dispone del “marcado CE” concedido en el año 2002 por la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo para todos sus productos (implantes no activos de clase III en forma de polvo fino, granulado, chips esponjosos, tapones craneales y esponjas porosas de fosfato tricálcico). Todas las actividades de análisis y control de calidad necesarias durante el proceso de producción de KERAMAT son contratadas al ICG. Existe un feed-back entre la empresa y el centro de investigación a través de actividades de I+D, de este modo la empresa dispone de nuevos procesos y productos que incrementan su competitividad.

1.2- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La esperanza de vida en el siglo pasado se ha visto incrementada de forma notable en todo el mundo. En España, pasó de estar en los 37.5 años para las mujeres en el año 1900, a los 85.71 en el 2016 con previsiones de alcanzar los 86.41 en 2021; y en los hombres, de los 33.9 años a los 80.26 y 81.31 para las mismas fechas respectivamente. En la comunidad autónoma gallega, la esperanza de vida actual se sitúa en los 85,83 años para las mujeres y en los 79,44 años para los hombres. A este hecho, se le suma que aproximadamente el 25 % de la población gallega tiene más de 65 años¹. Este panorama demográfico afecta, entre otros, a las necesidades sanitarias de la población. El incremento de la incidencia de patologías del sistema musculoesquelético da lugar a que se produzca una mayor demanda de materiales como son las

¹ Datos extraídos del “Instituto Nacional de Estadística” y del “Instituto Galego de Estatística”.

biocerámicas, para que ayuden a su restauración funcional. Estas son empleadas en especialidades como la cirugía ortopédica, maxilofacial y restauradora, la traumatología y la odontología. Entre sus aplicaciones más frecuentes destacan: el relleno de cavidades a causa de tumores o quistes, favorecer la curación de fracturas producidas en huesos de baja densidad, recubrimiento de las prótesis de cadera para restaurar patologías articulares, incrementar la calidad y cantidad de hueso disponible para posteriores restauraciones protéticas sobre implantes de titanio osteointegrados... Todas estas aplicaciones causan un aumento de la calidad de vida en la población de edad avanzada restaurando sus funciones esenciales como son la locomotora y la masticatoria, lo que les proporciona una mayor autonomía.

Tradicionalmente las biocerámicas se dividen en inertes, bioactivas y reabsorbibles; a pesar de que los límites entre ellas son en ocasiones difusos. En los últimos 20 años se realizó un considerable esfuerzo de investigación en materiales como la hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP), el Bioglass®, las vitrocerámicas A/W, los cementos óseos... Gracias a esto, el área de las biocerámicas progresó extraordinariamente, tanto en la síntesis de nuevos materiales como en el conocimiento básico de los fenómenos que se producen tras la implantación, como la aparición de interfases material-tejido, las respuestas tisulares, la estabilidad del implante a largo plazo, etc.

Desde un punto de vista cronológico, los primeros estudios sobre biocerámicas se refieren a la síntesis de compuestos tales como HA y TCP, y al estudio de sus composiciones químicas y mineralógicas. Dichos estudios fueron seguidos por aquellos que versaban sobre la implantación de dichos materiales y las respuestas del sistema vivo a la misma; y numerosos trabajos sobre propiedades mecánicas de implantes de distintos materiales, así como intentos para optimizarlas. Como resultado de estas investigaciones, hacia el 1980 comenzaron a comercializarse piezas implantables confeccionadas con biocerámicas, particularmente de fosfatos cálcicos y vidrios bioactivos, por compañías internacionales como son SBM, Millenium Biologix,

Ceraver, MCP, Merck Biomaterial, Zimmer SAS, BIOLAND y en Galicia, KERAMAT S. L. (1999).

En la actualidad, la atención se centra más en las propiedades superficiales y composición de los implantes, para adaptarlos a los requerimientos de los tejidos huésped. Simultáneamente, adquirió relevancia el diseño microestructural de los mismos, para obtener las propiedades biomecánicas y biológicas apropiadas.

Según Holmes (1976), todos los órganos, entre los que se encuentra el hueso, tienen un componente parenquimático (parte fisiológicamente activa), y un componente de soporte o “estroma”. En el caso del hueso, el estroma está formado por tejido duro, compuesto principalmente por carbohidroxiapatita microcristalina, formando una estructura tridimensional con poros interconectados de entre 100 y 300 μm , que en situaciones normales alojan las osteonas y sistemas Haversianos. La evidencia científica demuestra que un defecto óseo puede ser regenerado de forma más fácil y predecible si es implantado en el interior del mismo un sustituto del estroma, con las mismas características, que ofrezca un soporte adecuado para el alojamiento de las osteonas. El biomaterial sirve de andamio para la colonización de células óseas, lo que favorece la aparición de hueso neoformado. La colocación del material de regeneración resulta imprescindible cuando estos defectos no pueden ser regenerados por completo espontáneamente en toda la vida del animal; es decir, los que poseen un “tamaño crítico” como lo definieron Schmitz y Hollinger en 1986 (1). Este tamaño se sitúa entre los 5 y 200 mm en función de la especie.

El incremento de la demanda de las biocerámicas, los avances tecnológicos y el apoyo legislativo en forma de financiamiento, no sólo favoreció progresos en la investigación científica; si no que también significó un gran aumento en la presencia en el mercado mundial de las biocerámicas. Su demanda mundial en el año 2010 produjo aproximadamente 9.800 millones de dólares. Y por aquel entonces ya se preveía un incremento anual del mercado de las cerámicas de uso en medicina de un 6-7%, que podría alcanzar los 13.500 millones de dólares en 2015 y los 16.300 millones de dólares en 2018. En lo que se

refiere al mercado de biocerámicas para fines ortopédicos, se estimó que el gasto mundial podría alcanzar cerca de los 2000 millones de dólares en el 2015, y aproximarse a los 2500 para el año 2018². (Fig. 1).

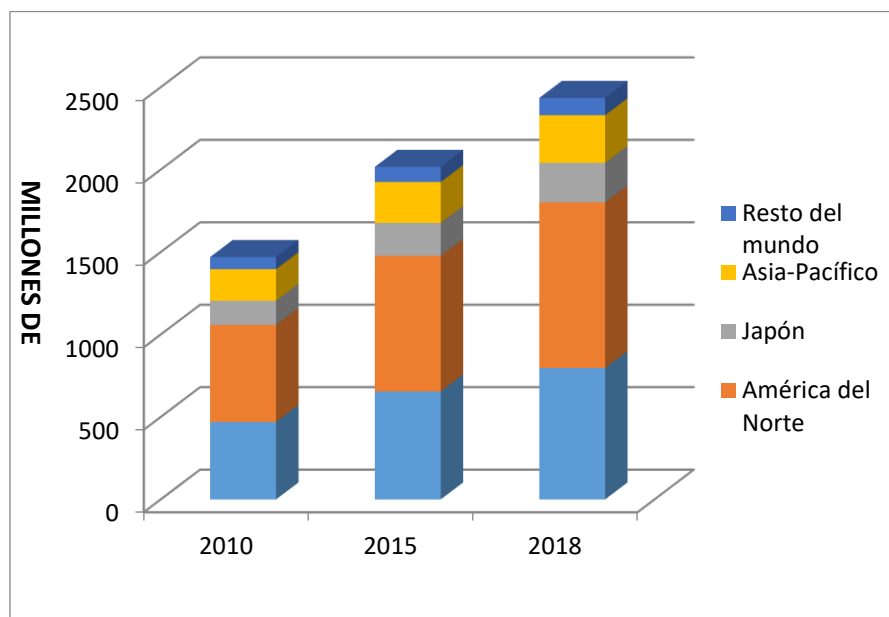


Fig. 1.1: Gráfica en la que se muestra la previsión del incremento en la demanda mundial de biocerámicas con fines ortopédicos.

Este tipo de materiales comenzaron a ser estudiados en el Instituto de Cerámica de Galicia (ICG), centro en el que se realizó la presente tesis doctoral, en el año 1986. Desde entonces se ha desarrollado una intensa labor científica y tecnológica en este campo, que además de numerosos resultados en publicaciones, tesis doctorales y patentes; dio lugar a la creación de una empresa, KERAMAT S.L., única fabricante

² Datos recogidos de un informe del mercado mundial de biocerámicas publicado por la Acmite Market Intelligence (World Medical Ceramic Market, 2011)

española de biocerámicas que comercializa los hallazgos del ICG en este ámbito. En este mismo centro, recientemente se ha realizado un estudio longitudinal en el que se comparó cómo se producía el relleno óseo con dos biocerámicas comerciales, el beta-fosfato tricálcico (β -TCP) y Deproteinated Bovine Bone (DBB), que en su composición es fundamentalmente hidroxiapatita (HA), transcurridas 1, 4, 8, 16, 32 y 52 semanas (2). Los resultados del mismo muestran que el patrón de crecimiento de hueso nuevo es diferente en ambos sustitutos óseos. Los defectos rellenados con β -TCP se produce mayor cantidad de hueso neoformado que está directamente relacionado con la mayor reabsorción que sufre este material en comparación con la HA. Pero, es necesaria una comparativa de ambos materiales de modo que tengan una estructura controlada y equiparable a nivel micro y nanoscópico con piezas totalmente densas y porosas. De este modo se pretende estudiar la influencia de composición química del material en la formación de hueso. Por tanto, se va a realizar un estudio transversal a 16 semanas en el que se emplean como injertos óseos ambos materiales comerciales, y los sustitutos sintetizados de β -TCP e HA totalmente densos y con porosidad controlada.

Para la realización de las síntesis de los materiales biocerámicos, tanto hidroxiapatita como beta-fosfato tricálcico, se emplearon métodos que fueron puesta a punto en el ICG, basados en precipitaciones controladas de los fosfatos a partir de nitrato cálcico y ácido fosfórico a un pH determinado (3,4).

Posteriormente, los materiales obtenidos fueron caracterizados mediante diferentes técnicas instrumentales para garantizar la pureza de estos, así como para determinar su estructura cristalina, micro y nanoporosidad, densidad real, superficie específica, tamaño medio de grano, etc. Tales métodos son la Difracción de Rayos X, la clasificación granulométrica vía húmeda, la porosimetría con Hg, la microscopía óptica y electrónica de barrido, el método BET para hallar la superficie específica, etc.

A continuación, se conformaron implantes con una densidad que supere el 97% y, por otro lado, se obtuvieron esponjas con una micro y

nanoporosidad, y con una interconectividad controladas. Con las piezas debidamente conformadas, se estudiaron diferentes tratamientos térmicos para la sinterización de las mismas con la finalidad de obtener las propiedades físicas deseadas.

El injerto de los implantes preparados para pequeños animales se realizó en la calota craneal de conejos New Zealand. Para lo cual fue necesario efectuar quirúrgicamente defectos óseos de diámetro prefijado en los que se eliminó tanto la cortical interna como externa. Dichos orificios fueron rellenados con los materiales a comparar (HA y β -TCP) y cubiertos por una membrana de colágeno. A continuación, se extrajeron muestras tras el transcurso de 4 meses para la comparativa del crecimiento óseo en función de la composición química del material.

Con la finalidad de realizar el estudio histológico, se procedió a la preparación de láminas delgadas con el sistema para tejidos duros (hueso, esmalte y dentina, minerales...), procedimiento complejo que se lleva a cabo con una técnica específica puesta a punto en el ICG. A partir de estas láminas se estableció una morfometría ósea con ayuda del programa informático "ImageJ" para cada uno de los materiales a distintos tiempos de interacción de los mismos con el hueso.

1.3- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.3.1- EL TEJIDO ÓSEO

1.3.1.1- Definición y Funciones

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conjuntivo, vivo, complejo, metabólicamente activo y altamente organizado. Entre las funciones más importantes del hueso destacan (5):

- Soporte mecánico del cuerpo, movimiento, locomoción.
- Sostén de los tejidos blandos, así como lugar de inserción de tendones de músculos esqueléticos.
- Soporte y protección de órganos internos, cerebro y médula espinal.
- Realización de movimientos a través de la contracción de músculos esqueléticos que hacen que se muevan los huesos en los que se insertan.
- Homeostasis del calcio y del fósforo. El hueso es un reservorio de iones minerales, contiene el 99% del calcio del cuerpo humano.
- Producción de células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas), proceso denominado hemopoyesis o hematopoyesis. Dicha producción tiene lugar en la médula ósea roja, alojada en los huesos fetales y en algunos huesos adultos (pelvis, esternón, costillas, cráneo, vértebras y extremos proximales de húmero y fémur).
- Almacenamiento de triglicéridos en la denominada médula ósea amarilla, constituida por adipocitos que pueden actuar de fuente energética. La médula ósea amarilla se forma en zonas donde previamente había médula ósea roja.
- Sostén de dientes durante la trituración del bolo.

1.3.1.2- Clasificación Macroscópica de los Huesos

La clasificación macroscópica del tejido óseo lo divide en hueso cortical o compacto y hueso esponjoso o trabecular (6). Ambos tejidos presentan diferencias en su organización histológica y en sus propiedades. El esqueleto está compuesto en su mayoría por hueso cortical, en el interior de éste se sitúa el hueso esponjoso, que alberga en sus cavidades a la médula ósea roja o amarilla. Estas cavidades, observables a simple vista, están delimitadas por las trabéculas de aproximadamente 1 mm de diámetro que le otorgan una porosidad de entre el 50 y el 90%. El tejido óseo trabecular se encuentra fundamentalmente en huesos que no reciben tensión o presión (7).

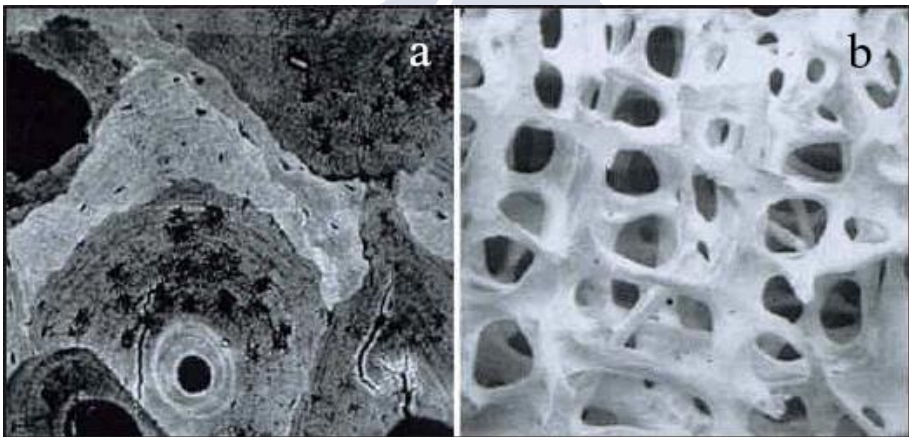


Fig.1.2: Microfotografías electrónicas de (a) hueso cortical y (b) hueso trabecular. Adaptada de (8) con permiso de Elsevier.

Según su morfología, los huesos se dividen en huesos largos, cortos, planos, irregulares, sesamoideos y suturales.

Los huesos largos están formados por dos extremos, epífisis, y una parte central alargada y cilíndrica, diáfisis. La epífisis consta de hueso esponjoso cubierto de fina capa de hueso compacto. La diáfisis, en cambio, se trata prácticamente de hueso compacto con una pequeña

porción de esponjoso en el interior. Son ejemplos el húmero, el fémur, la tibia, el peroné...

Los huesos cortos generalmente tienen una forma cúbica, disponen de un centro esponjoso cubierto por una delgada capa de hueso compacto. Como ejemplo figuran los huesos del carpo y del tarso.

En los huesos planos existen dos tablas de hueso compacto separadas por una zona estrecha de hueso esponjoso, denominada diploe. Se trata de huesos delgados como son los huesos del cráneo, el esternón, la escápula... (9).

Los huesos irregulares son aquellos que no se agrupan en ninguna de las categorías mencionadas. Contienen proporciones variables de hueso compacto y esponjoso. Son huesos irregulares las vértebras, algunos huesos faciales, los huesos de la cadera, etc.

Por último, los huesos sesamoideos (denominados así por tener morfología similar a una semilla de sésamo), se forman en tendones en los que existe tensión mecánica para protegerlos del desgaste y de desgarros, como en las manos y los pies. Su número es variable de una persona a otra. Las rótulas son ejemplo de huesos sesamoideos presentes en todas las personas.

Los huesos suturales tienen morfología variable y lo que los clasifica es fundamentalmente su localización entre las suturas que articulan algunos huesos del cráneo. Se presentan en número variable.

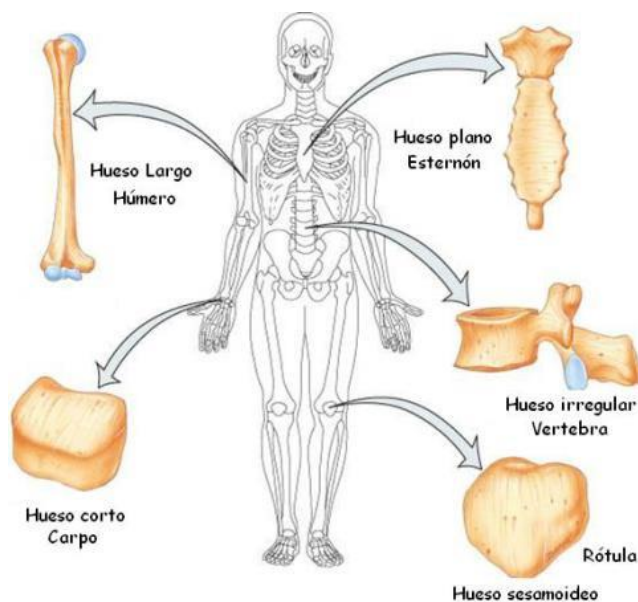


Fig.1.3: Imagen en la que se muestran ejemplos de los diferentes tipos de hueso. Imagen libre.

1.3.1.3- Descripción Histológica del Tejido Óseo

El tejido óseo está conformado por los siguientes componentes: matriz ósea, células, periostio y endostio.

Los grupos celulares presentes en el tejido óseo que se encargan de su formación, mantenimiento y reparación son: las células osteogénicas (stem cells), los osteocitos, las células de revestimiento óseo, los osteoblastos y los osteoclastos.

Las células osteogénicas son células madre que provienen del mesénquima y a través de la división celular dan lugar a los osteoblastos. La diferenciación de estas células está controlada por

múltiples factores de transcripción, los más importantes son el Cbfa-1 – Core-binding factor $\alpha 1$, también denominado Runx2 (run-related-transcription factor 2); y el osterix (Osx) (10). Los osteoblastos son células cúbicas de gran tamaño, poseen un núcleo ovoide y su citoplasma contiene abundante retículo endoplasmático rugoso y un destacado aparato de Golgi. Sus funciones son la de síntesis ósea e intervención en la calcificación de la matriz, pues segregan osteoide unidireccionalmente a la superficie del hueso. Están situadas en la superficie de la matriz ósea adyacentes unas a otras. Cuando quedan rodeadas de matriz recién sintetizada pasan a denominarse osteocitos. Existen variaciones entre los osteoblastos de diferentes regiones de hueso (11).

Los osteocitos son células aplanadas que presentan prolongaciones citoplasmáticas; se sitúan de forma individual en el interior de las lagunas, pero establecen comunicaciones con otros osteocitos a través de las prolongaciones citoplasmáticas que van por los canalículos. De este modo, existe intercambio de metabolitos y moléculas de señalización con osteocitos, osteoblastos y células de revestimiento óseo circundante, siempre y cuando la distancia no supere las 100 micras. Cuando se produce la muerte de un osteocito, la matriz se reabsorbe (12).

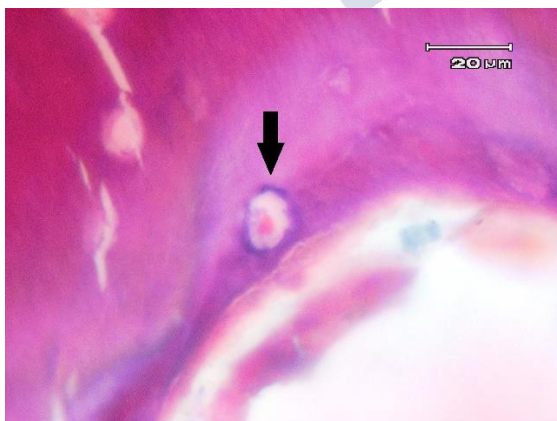


Fig. 1.4: Imagen en detalle de un osteocito en una laguna ósea.

Las células de revestimiento, también denominadas osteoblastos inactivos o en reposo, pertenecen al igual que las anteriores a la familia de los osteoblastos. Son células inactivas que cubren la superficie ósea que no está en proceso de remodelación. De morfología aplanada, apenas poseen organelas citoplasmáticas, por lo que su actividad metabólica es escasa. Las células de revestimiento óseo que se sitúan en la superficie externa del hueso se denominan periósticas, y las que lo hacen en la superficie interna, endósticas.

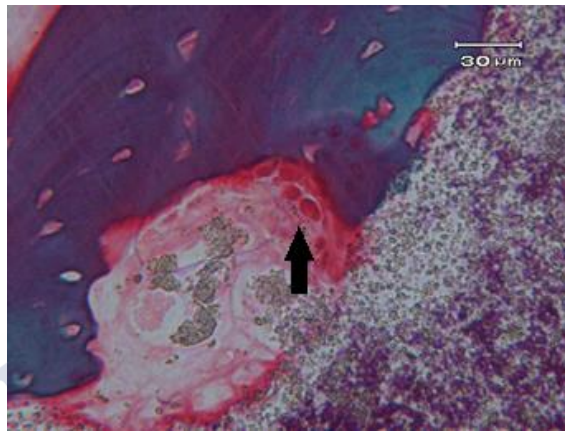


Fig. 1.5: Imagen de microscopía óptica en la que se indican los osteoblastos sobre la superficie ósea (flecha). Se trata de células periósticas con escasas organelas.

Los osteoclastos son células móviles, gigantes que tienen prolongaciones en un borde indentado a través del cual liberan ácidos que disuelven minerales y enzimas lisosómicas que digieren sustancias orgánicas, dando lugar a la resorción de la matriz ósea. Estas zonas de descomposición ósea se denominan lagunas de Howship (13). Estas células tienen su origen en la línea hematopoyética de monocitos-macrófagos. Se caracterizan por ser células grandes (entre 30 y 100 micras), multinucleadas (entre 3 y 30 núcleos) y poseer un citoplasma acidófilo. Se diferencian de otras células de características iguales por su localización en la laguna de Howship. Por otra parte, presentan receptores en la superficie como el receptor activador del factor nuclear

kB (RANK), el factor estimulador de la colonia de macrófagos, vitronectina y calcitonina (14).

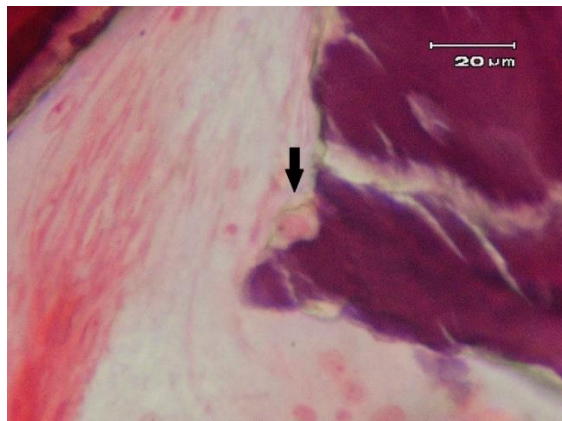


Fig. 1.6: Imagen de un osteoclasto sobre la superficie ósea, en la que se formará una zona de reabsorción que provocará un socavamiento. Se observa que se trata de una célula multinucleada.

La matriz ósea se trata de un compuesto biológico que presenta una parte inorgánica y otra orgánica. La parte inorgánica representa alrededor del 50% del peso de la matriz, presenta iones principalmente de fosfato y de calcio, pero también contiene bicarbonato, magnesio, potasio, sodio y citrato. Los cristales de calcio y fósforo tienen estructura de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y alrededor de los mismos está presente una capa de agua que facilita el intercambio entre el líquido intersticial y el cristal. La parte orgánica de la matriz está conformada principalmente por fibras de colágeno tipo I, aunque también existen en menor medida, proteínas no colágenas como son las glicoproteínas y proteoglicanos, factores de crecimiento, etc. Esta asociación de cristales de hidroxiapatita y de fibras de colágeno le proporciona la combinación de flexibilidad, rigidez y resistencia necesarias al hueso.

La matriz ósea se forma a partir de macromoléculas segregadas por los osteoblastos. Esta matriz recién formada todavía sin calcificar se denomina osteoide o prehueso, y está compuesta por colágeno y

proteínas no colágenas. A una determinada distancia del osteoblasto, la matriz comienza a calcificar convirtiéndose en hueso mineralizado. Las funciones de la matriz ósea son, por un lado estructural, y por otro, servir de reservorio para factores de crecimiento y citoquinas.

Las superficies interna (endostio) y externa (periostio) del hueso están cubiertas por tejido conectivo y células osteogénicas que nutren al tejido óseo y proporcionan osteoblastos en caso de reparación o crecimiento óseo. El endostio se sitúa en el conducto medular, en las cavidades de hueso esponjoso y en los conductos de Havers y de Volkmann que se describirán a continuación. El periostio se une al hueso a través de fibras de colágeno llamadas fibras de Sharpey (15).

1.3.1.4- Clasificación Microscópica de los Huesos

Microscópicamente, se pueden observar dos tipos de hueso; el hueso inmaduro o primario (woven bone) y el hueso secundario, maduro, laminar o lamelar. El primero se encuentra en el hueso fetal, en el embrión o durante el crecimiento en niños. En adultos se presenta en zonas que requieren una formación ósea acelerada; por ello se observa en el callo óseo que se forma en la curación de fracturas y en algunas enfermedades como, por ejemplo, la Enfermedad de Paget o la fluorosis. También hay presencia de hueso primario en los alveolos dentales, en las proximidades de las suturas craneales y en algunas inserciones tendinosas. Los cristales de hidroxipatita están desordenados y se presentan en menor cantidad. Las fibras de colágeno presentan una orientación aleatoria, y los espacios entre fibras son de mayor tamaño, también contiene fibrillas de colágeno trenzadas. Como su formación es de mayor rapidez, en el hueso inmaduro existe una elevada proporción de osteocitos y éstos son más voluminosos.

En el hueso compacto maduro o laminar la estructura presenta mayor complejidad. Las fibras de colágeno se encuentran formando laminillas de 3 a 7 μm de espesor. Estas laminillas se disponen en capas concéntricas formando el conducto de Havers, que contiene vasos

sanguíneos, vasos linfáticos y nervios; su área de sección es de 2500-12000 μm^2 , lo que le proporciona una porosidad de 3-12%. La orientación de las fibras es diferente en cada unidad laminar (16). Este conducto tiene un diámetro variable debido a la constante remodelación ósea (los sistemas más jóvenes tienen el conducto de Havers más ancho). Entre las laminillas hay pequeños espacios llamados lagunas que contienen osteocitos. Estas lagunas se comunican entre sí, con el conducto de Havers y con el exterior a través de canales que atraviesan las laminillas (conductos de Volkmann). En el interior de los conductos de Volkmann hay líquido extracelular y prolongaciones de los osteocitos, ya que se comunican entre sí. Esta unidad estructural y metabólica se denomina osteona o sistema de Havers, y tiene un diámetro externo de 200 a 250 μm . Su configuración es cilíndrica y su disposición longitudinal. Está compuesta por las laminillas de colágeno, el conducto vascular central (conducto de Havers, con un diámetro de 50 a 80 μm), las lagunas con los osteocitos y los conductos de Volkmann (17).

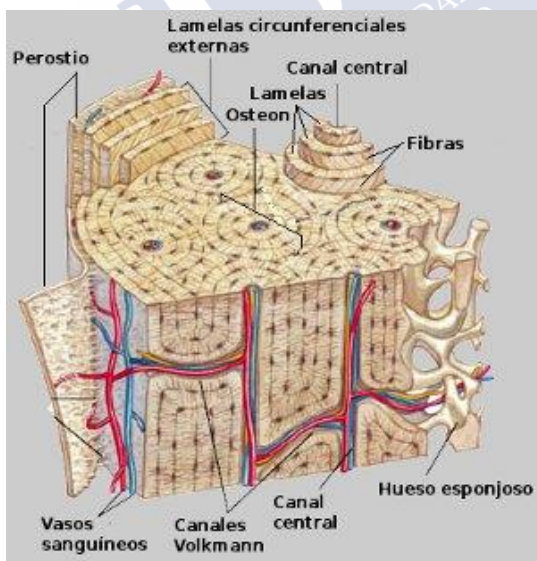


Fig. 1.7: Dibujo de la estructura microscópica del hueso compacto. Imagen libre.

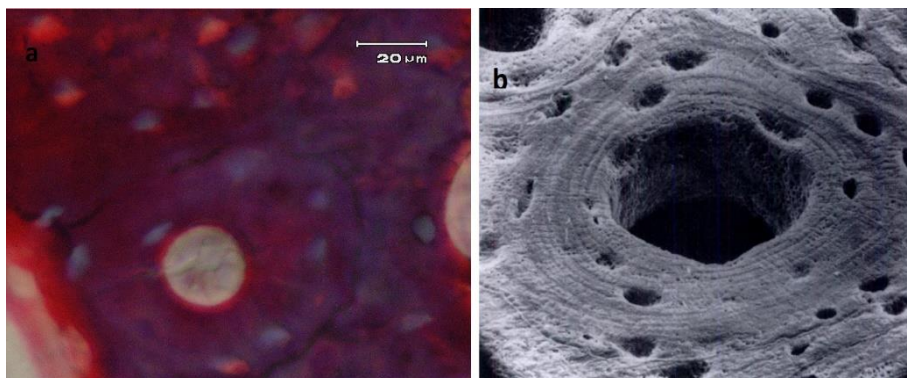


Fig.1.8(a): Fotografía de una osteona observada a través de microscopio estereoscópico. Se observa claramente el conducto de Havers y con un tono más azulado las lagunas osteocitarias.

Fig. 1.8(b): Microfotografía electrónica de barrido de una osteona, donde se observan las lamelas circunferenciales concéntricas al conducto central de Havers y los surcos que las separan. También se observan como agujeros o depresiones en donde se albergan los osteocitos. Adaptada de (9) con permiso de Elsevier, licencia nº 4366121166404.

En su estructura, el hueso esponjoso o trabecular no tiene osteonas. Está compuesto por unidades óseas estructurales delimitadas por líneas de cemento. En este caso, las laminillas se encuentran formando columnas que dan lugar a las trabéculas. Entre estas laminillas existen lagunas que contienen osteocitos.

Las líneas de cemento son una unidad estructural que delimita la interfase entre el hueso viejo y el hueso nuevo. Existen dos tipos de líneas de cemento: las líneas de reposo y las líneas de inversión. Las primeras, con forma lisa y paralelas a las láminas, son producidas por osteoblastos cuando comienzan a formar nuevo hueso tras una irrupción en la formación de hueso. Las segundas, se forman sobre una superficie reabsorbida por osteoclastos. Entre la matriz ósea y los osteones secundarios, se encuentra también una línea de cemento.

1.3.1.5- Procesos de Formación Ósea

El tejido óseo se forma a través de un proceso denominado osificación u osteogénesis. Existen dos patrones diferentes de formación de hueso, la osificación endocondral y la osificación intramembranosa (18).

A través de la osificación intramembranosa o directa se forman los huesos planos del cráneo (frontal, parietal, occipital, temporal) y algunos huesos faciales como el maxilar y la mandíbula. En este tipo de osificación, el tejido conectivo funciona como plantilla para el depósito de la matriz ósea. En el interior de una membrana conjuntiva, aparece un centro de osificación primario en el que se produce la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos. Éstos sintetizan el osteoide que luego se mineraliza englobando a algún osteoblasto (que se convierte en osteocito). Se forman varios grupos de blastemas óseos que, cuando confluyen, le dan al hueso nuevo un aspecto esponjoso. Tras unos días, se depositan en la matriz calcio y otras sales minerales produciéndose la calcificación del nuevo hueso. Entre las trabéculas penetran vasos sanguíneos y células mesenquimales que formarán la médula ósea. La parte de la membrana que no se osifica da lugar al endostio y al periostio (5).

La osificación endocondral o indirecta, propia de los huesos largos, se produce a través de la sustitución de un primordio de cartílago hialino por tejido óseo. El cartílago hialino se elonga, los condrocitos que lo forman se hipertrofian, esto conlleva a una reducción de la matriz cartilaginosa que posteriormente se mineraliza. Los condrocitos mueren por apoptosis y las cavidades remanentes son ocupadas por capilares y células osteogénicas del tejido conectivo adyacente, que se diferenciarán en osteoblastos. Esto es lo que se denomina el centro de osificación primario, pues inicia el proceso que será continuado por los centros de osificación secundarios, dando lugar a la diáfisis del hueso largo. Estos centros de osificación, que se denominan calcoferitas, contienen vesículas de la matriz, que se observan como cuerpos esféricos de unas 20-200 nm que proporcionan cristales e iones para la mineralización de la matriz. (19).

La cavidad medular se forma a partir del vaciado del interior de la diáfisis por la actividad de los osteoclastos, mientras el centro de osificación se extiende hacia los extremos del hueso. Posteriormente aparecen, a consecuencia del desarrollo vascular y siempre, a consecuencia de la entrada de los vasos en la estructura sin mineralizar los centros de osificación secundarios, que darán lugar a las epífisis óseas. En éstos no se producirá cavidad medular, quedando el interior conformado por hueso esponjoso.

En los períodos de crecimiento fetal y postnatal, la estructura ósea sufre modificaciones a través de su crecimiento en diámetro y longitud. La definición de su forma es a través del modelado endoóseo y perióstico y del remodelado.

Antes de la edad adulta, entre la diáfisis y las epífisis permanecen restos de cartílago hialino que conforman la placa epifisaria (metáfisis) o placa de crecimiento, responsable del crecimiento de los huesos en sentido longitudinal. El crecimiento en anchura y grosor se produce a partir de procesos de aposición reabsorción (20).

1.3.1.6- Remodelación Ósea

El proceso continuo y generalizado en todo el sistema esquelético, por el cual pequeñas zonas de hueso son reemplazadas por nuevo tejido óseo se denomina remodelación ósea. En cambio, se conoce como modelado óseo el proceso asociado al crecimiento y reorganización ósea en la niñez y adolescencia (18). Este proceso de modelado se lleva a cabo, también, por medio de procesos de reabsorción y de aposición. Es relevante el efecto de traslación que se produce en el crecimiento de algunos huesos (viscerocráneo) en el cual se produce una auténtica traslación de un hueso por procesos de aposición y remodelación en zonas opuestas.

En el remodelado óseo, el cual dura toda la vida, el tejido óseo se reabsorbe y reemplaza de manera equilibrada para mantener la integridad mecánica, forma y masa del esqueleto; así como para la

reparación en caso de pérdida de estructura ósea. La resorción y la formación óseas ocurren de forma sucesiva en la misma localización y en el mismo orden. Esta secuencia de resorción y formación de hueso se lleva a cabo en una localización determinada que se denomina “unidad básica multicelular de recambio óseo” (BMU) (21).

Las zonas de resorción y depósito óseo se encuentran separadas entre sí geográfica y cronológicamente. En humanos, un 5 % de la masa ósea está en proceso de remodelación de forma constante, y anualmente es reemplazado el 25% del hueso trabecular y el 3% del hueso cortical. Estos porcentajes de remodelación son diferentes en función de la zona anatómica en la que tenga lugar (22).

El remodelado y modelado óseos son diferentes en el hueso cortical y en el hueso esponjoso. La unidad estructural fundamental del remodelado en el hueso cortical es el osteón. Los osteoclastos comienzan una reabsorción longitudinal ensanchando el canal, que posteriormente es rellenado por los osteoblastos en láminas concéntricas. En el periodo intermedio entre la reabsorción y el depósito de la matriz ósea, la pared del canal está revestida de células mononucleares. La formación del osteón necesita un tiempo de entre 2 y 4 meses. En el hueso esponjoso el remodelado modifica su arquitectura, esto le permite una adaptación estructural según la carga funcional, siguiendo la “Ley de Wolff” (23,24). Al inicio de este proceso, hay un reclutamiento de osteoclastos que forman una cavidad en la superficie del hueso trabecular de unas 50 μm de media. Al finalizar la fase de reabsorción, los osteoblastos comienzan a depositar nueva matriz.

La regulación del remodelado óseo depende de factores sistémicos y locales. Los factores locales funcionan de forma paracrina y autocrina, tanto los osteoclastos, como los osteoblastos y las células inflamatorias e inmunitarias pueden ejercer como fuentes o dianas de las moléculas de señalización. Por otra parte, existen diversos factores que influyen en el proceso de remodelado óseo: la actividad física, el sedentarismo, cambios en la alimentación, el consumo de determinados minerales (calcio y fósforo fundamentalmente; y magnesio, flúor y

manganeso en menor medida) y vitaminas (vitamina A, C, D, K y B12), los niveles de diversas moléculas osteorreguladoras (factores de crecimiento tipo insulina –IGF-, hormonas tiroideas –T3 y T4- y paratiroidea, los estrógenos y andrógenos, el calcitriol y la calcitonina, la prostaglandina E2, la leptina, las estatinas, las proteínas morfogenéticas óseas –BMPs- etc.).

El proceso de remodelación ósea, comienza con la aparición de osteoclastos que producen un pequeño hoyo de resorción, que se puede visualizar en la superficie ósea hasta 10-14 días posteriores a su producción (25). A continuación, los osteoclastos se desplazan a una nueva zona. Estos osteoclastos se forman gracias a la unidad formadora de granulocitos y macrófagos (CFU-GM), que actúa como precursora, previa fase de activación (26). Las principales citoquinas y factores estimuladores de colonias implicados en la formación de osteoclastos son: factor de células madre (stem cell factor , SCF), macrófago CSF (M-CSF), IL-6, IL-11, IL-3, IL-1, TNF α , TNF β (27).

Existen inhibidores de citoquinas que impiden la resorción ósea suprimiendo la formación y la maduración de los osteoclastos, Estos son el IFN-gamma (28), IL-4 e IL-13 (29).

Se sabe que son los osteoblastos los que controlan el desarrollo y la actividad de los osteoclastos (30). Tras descubrir que los osteoclastos no poseen receptores para los agentes más importantes en la resorción ósea, como son la parathormona y la 1,25-dihidroxivitamina D, se observó que la activación de los osteoblastos por dichos agentes promovía el inicio de la resorción ósea. Esto se debe a que los osteoblastos expresan una citoquina de la familia TNF denominada RANK Ligand (Receptor Activator of Nuclear Factor, kappa beta ligand), que se une al receptor RANK presente en la membrana de los precursores osteoclásticos provocando la activación de estos (31).

Existe otra proteína perteneciente a la superfamilia de TNFR que bloquea la diferenciación de los osteoclastos. Ésta es la osteoprotegerina (OPG), y actúa bloqueando los receptores RANKL a los que se une. A partir de experimentos en ratones, se determinó que

la sobreexpresión de OPG produce osteopetrosis (32); en cambio, el bloqueo del gen de la OPG, produce una osteoporosis severa (33). Los estrógenos aumentan la secreción de OPG, por lo que inhiben la resorción ósea.

La fase de resorción es seguida por una fase en la que se deposita una línea cemental, matriz mineralizada no colágena descrita por Ebner en 1875, que separa el hueso antiguo del nuevo hueso que se formará. Esta matriz es secretada por osteoblastos y se une a través de las invaginaciones presentes en la matriz de colágeno desmineralizada a causa de la actividad de los osteoclastos (34). Para ello, los osteoblastos aparecen y depositan una matriz descalcificada (osteoide) que posteriormente se mineraliza. La aparición de los osteoblastos viene determinada por la diferenciación de las células osteogénicas (stem cells), que forman unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) capaces de diferenciarse en colonias de osteoblastos, fibroblastos, condrocitos, adipocitos y miocitos (35). Para que tenga lugar dicha diferenciación celular, intervienen factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF beta) (36), las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (37) y los factores de crecimiento similares a insulina (IGF I e IGF II) (38). Por otra parte, el papel de la matriz extracelular (ECM) es de gran importancia en la diferenciación celular de los osteoblastos. Ésta provee una estructura para que las células se adhieran y migren, además, influye en casi todas las actividades celulares. A su vez, la ECM se ve influenciada por las proteasas (metaloproteinasas –MMP-, activadores de plasminógenos –PA- y colagenasas intersticiales, entre otras) que son segregadas por osteoblastos y osteoclastos, lo que hace que se encuentre en remodelación constante (39).

1.3.1.7- Homeostasis de Calcio y Fosfato

La homeostasis de calcio se trata de una función indispensable del hueso, por lo que es necesaria una breve descripción de la misma. Esto

se debe a que el hueso es un importante reservorio de calcio, ya que almacena el 99% del calcio corporal.

Es muy importante mantener el nivel de calcio circulante (calcemia) para que tengan lugar muchos de los procesos fisiológicos, como por ejemplo: la motilidad celular, la contracción muscular, el flujo axonal, las corrientes citoplasmáticas, los movimientos de cromosomas, la liberación de neurotransmisores, la coagulación, la endocitosis y la exocitosis (18). La calcemia se mantiene controlando, por un lado, los índices de resorción ósea de calcio que pasa a la circulación sanguínea debido a la acción de los osteoclastos y, por otro, controlando el depósito de calcio en el hueso a través de la actividad de los osteoblastos. Los niveles plasmáticos de calcio deben situarse en un rango que oscila entre los 9 y los 11 mg/100 ml, sin admitir pequeñas variaciones, ya que podrían resultar mortales (40).

El intercambio de calcio está regulado fundamentalmente por hormonas. La de mayor importancia es la hormona paratiroidea, la cual es sensible a cambios mínimos, como puede ser una reducción del 1-2% en la concentración extracelular de calcio. Cuando esto sucede, se produce un aumento en la secreción de la hormona paratiroidea (PTH). Ésta actúa sobre el riñón, el esqueleto y el intestino. Su acción sobre el riñón produce un incremento de la absorción renal del calcio y una disminución de la absorción del fosfato. Sobre el hueso, su actuación es directa también, fomentando la liberación de fosfato y calcio estimulando, en definitiva, la resorción ósea. Su acción sobre el intestino es indirecta, la PTH por medio de la síntesis de 1,25-dihidroxitamina D, que mejora la absorción intestinal de calcio y fosfato. Estas acciones, en cambio, son inversas en el caso de que se inhiba la secreción de PTH, por un mecanismo de control de retroalimentación, a causa de un aumento en el calcio extracelular.

El fósforo es también un componente muy importante del hueso, que interviene en muchos procesos metabólicos. Alrededor del 88% del total del fosfato que reside en el cuerpo humano se encuentra en el esqueleto óseo. La concentración extracelular de este mineral presenta variaciones mayores que las de calcio; ya que es más dependiente de la

alimentación, del crecimiento, de los ritmos circadianos... La absorción de fósforo en el intestino es muy eficiente, situándose entre el 80 y el 90% del fósforo ingerido.

La concentración plasmática se ajusta fundamentalmente en el riñón a través del filtrado glomerular en los túbulos proximales, en ellos se reabsorbe un gran porcentaje del fosfato que es filtrado (85-90%). Este proceso es regulado por la PTH y por la proteína relacionada con la hormona tiroidea (PTHrP) (41).

La hipofosfatemia induce la síntesis de 1,25-dihidroxivitamina D que mejora la absorción de calcio y fosfato en el intestino y la liberación de ambos del esqueleto óseo. La hiperfosfatemia, en cambio, provoca el incremento de la secreción de PTH que aumenta el aclaramiento renal de fosfatos. Además, la 1 α -hidroxilasa tiene un efecto directo sobre el fosfato (42).

1.3.1.8- Propiedades Mecánicas del Hueso

El tejido óseo es un tejido duro mineralizado, con lo cual una de las propiedades que le son inherentes es la rigidez cuando es sometido a cargas elevadas. Lo deseable en los tejidos duros es que esta rigidez venga acompañada de resistencia, tenacidad, o ausencia de fragilidad. De este modo, se evitaría la producción de fracturas al ser sometidos a dichas cargas. Existe una relación lineal entre el módulo de Young y la resistencia a la flexión que presenta un tejido óseo. Para que un tejido sea considerado rígido, debe poseer un módulo de elasticidad mayor a 5 GPa (43).

El hueso fibrilar o primitivo, presente en el esqueleto embrionario, es isótropo, ya que presenta las mismas propiedades en todas las direcciones cuando es sometido a una fuerza. También es flexible y fácilmente deformable, aunque se recupera elásticamente. El hueso laminar, en cambio, es anisótropo, pues sus propiedades mecánicas

dependen de la relación entre la dirección de aplicación de las fuerzas con respecto a la dirección de sus estructuras.

En lo que respecta a su porosidad, el hueso compacto presenta una porosidad inferior al 30% (generalmente se hace referencia al 10%), mientras que en el hueso esponjoso ésta supera el 50%, pudiendo alcanzar cifras del 90%.

Las propiedades biomecánicas más estudiadas en el hueso son la resistencia a la tracción y compresión, el módulo de elasticidad o módulo de Young, la deformación por tracción, la dureza y la resistencia a la cizalla. Estas propiedades permiten predecir el riesgo de fractura ósea en un individuo. En algunos casos se hace referencia a la densidad ósea, pero existen autores que afirman que no se trata de una propiedad mecánica como tal. La densidad aparente del hueso cortical se sitúa en torno a 1.85 g/cm³, la densidad aparente del hueso esponjoso oscila entre 0.20 y 0.40 g/cm³.

La resistencia a la compresión y el módulo de elasticidad del hueso cortical son alrededor de diez veces superior que en el hueso esponjoso. En el hueso compacto la resistencia, como ya se ha mencionado, depende de la dirección de la fuerza aplicada. En el eje longitudinal la resistencia a la compresión es de 190 MPa y la a la tracción de 130 MPa. En el eje transversal, las resistencias a compresión y tracción son de 130 y 50 MPa respectivamente. En el hueso esponjoso la resistencia a la compresión se sitúa entre 2 y 20 MPa, y a la tracción en 3 MPa. El módulo de Young es 1.5 veces mayor en la dirección longitudinal que en la transversal, en cifras que se sitúan en 17000 MPa; la oscilación es mayor en el hueso trabecular, que en función de factores como la edad y la localización puede ir de 10 a 9650 MPa. El hueso compacto es poco dúctil, la rotura en él se produce sin deformación mínima tanto en compresión como tracción. El hueso esponjoso se comporta diferente, cuando es sometido a compresión, las trabéculas inicialmente tienen un comportamiento elástico, para luego combinarse en una segunda fase la compactación y la producción de fracturas.

Con el término de “calidad ósea”, se hace referencia a las características que influyen en la capacidad del esqueleto para soportar cargas funcionales y prevenir fracturas. La característica más determinante en el comportamiento del hueso cuando es sometido a cargas es la masa ósea (BMD –bone mineral density) pero resulta insuficiente para predecir el riesgo de fractura (44). El término calidad incluye, por tanto, características estructurales y microestructurales. Dentro de las características estructurales figuran la geometría y el tamaño del hueso, y el grosor de la cortical. Como características microestructurales se presentan la arquitectura del hueso esponjoso, la porosidad de la cortical, el tamaño, orientación y distribución de los cristales de hidroxiapatita, la presencia o ausencia de microcracks, la orientación de las trabéculas, el tamaño y el número de las osteonas, el número de laminillas intersticiales, la calidad y la orientación de las fibras en la matriz de colágeno y la relación entre el contenido de la fase orgánica, inorgánica y de agua (45,46).

A continuación, se describe brevemente cómo afectan los factores histológicos anteriormente citados. En lo que respecta a la porosidad, su incremento está asociado con una disminución de la resistencia a la fractura, debido a la disminución del área disponible para que tenga lugar la propagación de microcracks (47). Los microcracks son escisiones cortas (de entre 30 y 100 micras) que se producen como consecuencia de la acumulación de cargas prolongadas (debidas a la actividad diaria acumulada durante años) que dan lugar a la fatiga del hueso. Su propagación tiene lugar a lo largo de las líneas cementales en el hueso cortical. Su presencia tiene como consecuencia una degradación de la rigidez y su acumulación un aumento del riesgo de fractura.

En lo que a los cristales de hidroxiapatita se refiere, en el hueso joven hay presentes cristales de diferente tamaño, lo que le proporciona mayor resistencia ante la carga que el hueso envejecido, el cual presenta cristales de mayor tamaño que lo convierten en más frágil (45).

Cuanto mayor contenido mineral presente el hueso, más rígido será, pero también más frágil. La fracción mineral resiste mejor las

cargas de compresión que de tracción. El agua presente en los canaliculos vasculares y en las lagunas óseas, incrementa la dureza y resistencia óseas (48).

La resistencia a la tracción depende de la calidad y de la orientación de las fibras de colágeno. Cuando las fibras de colágeno se presentan paralelas al eje axial de la osteona, el hueso presenta mayor resistencia a la tracción y mayor deformación. La calidad de la matriz extracelular, que depende de la cantidad de colágeno y de su madurez o reticulado contribuye a la dureza o resistencia (49).

El número de laminillas intersticiales es directamente proporcional a la resistencia a la tracción. Con respecto a las osteonas, se ha descrito que, a mayor área transversal de éstas, menor resistencia a la cizalla y menor módulo de elasticidad presenta el hueso. A mayor número de osteonas por mm cuadrado, más duro es el hueso.

Algunos factores biológicos extrínsecos influyen sobre las propiedades mecánicas del hueso. Entre estos destacan la localización del hueso, la raza, el sexo, la edad, factores genéticos y la presencia de algunas enfermedades. Con respecto a la raza, la resistencia a la tracción es mayor en hombres blancos que en negros, pero a su vez en estos es mayor que en mujeres blancas. La formación de hueso durante el crecimiento y la pérdida de hueso con los años son diferentes entre hombres y mujeres. La mujer pierde más hueso trabecular y presenta un adelgazamiento cortical más acusado que el hombre. Por otra parte, los hombres poseen mayor resistencia a la cizalla y módulo de elasticidad que las mujeres, las cuales presentan una mayor deformación cuando el hueso es sometido a tracción (50). Quizá uno de los factores extrínsecos más importantes sea la edad. Tanto hombres como mujeres padecen una disminución progresiva de la estructura ósea y de las propiedades mecánicas de la misma con la edad. Se produce un aumento de la rigidez, y una disminución de la resistencia, de la absorción de energía y de la deformación por tracción. Estos hechos provocan un mayor riesgo de fractura y un incremento de la incidencia de osteoporosis. Estos cambios se deben al proceso de adaptación funcional, que unido a la supresión del remodelado óseo, da lugar a un hueso altamente

mineralizado y homogéneo, que permite la propagación de microcracks, siendo menos resistente. A su vez, la red de colágeno pierde capacidad de absorber energía por el aumento del porcentaje de colágeno desmineralizado (46).

La genética y la presencia de enfermedades también actúan como factores extrínsecos que influyen en la biomecánica ósea. Los factores genéticos influyen en la morfología y estructura del hueso, aunque su impacto disminuye con la edad. Enfermedades como la osteoporosis, osteomalacia y osteogénesis imperfecta cursan con afectación del metabolismo óseo (51–53). En ocasiones, estas patologías son secundarias al consumo de ciertos medicamentos como bisfosfonatos, corticosteroides, anticoagulantes, antipsicóticos... así como tratamientos para la epilepsia o la artritis (54–57).

Por último, factores medioambientales como la dieta y el ejercicio físico también actúan como reguladores de comportamiento mecánico del hueso. El consumo y absorción de nutrientes esenciales como el calcio, la vitamina D y la vitamina K, reduce el riesgo de padecer osteoporosis y fracturas; pues aumenta la resistencia ósea. La realización de ejercicio, produce cargas dinámicas que llevan al incremento de la masa ósea, tanto en hueso cortical como esponjoso (58,59).

Existen descritos en la literatura diversos métodos para medir la fuerza ósea. Frecuentemente se evalúa in vitro, sometiendo al hueso a fuerzas que se aplican en dirección axial (de tensión o compresión), y a fuerzas de flexión y torsión. Se han propuesto análisis de elementos finitos, pero por falta de consenso (60–62), el patrón de oro debido a su precisión y elevada repetibilidad, son los medidores de deformación, descubiertos en 1938, pero empleados para este fin en 1944 por Grudjian y Linssner. Estos sistemas miden el descenso de resistencia de un material que fue sometido a una fuerza según la deformación sufrida (contracción o estiramiento); es necesario para ello tener en cuenta la resistencia original del material. Posteriormente, en 1978, se descubrieron los sensores de fibra de Bragg, que fueron comercializados en 1995. A través del cambio de color de una luz

ultravioleta reflejada por una fibra que posee diferentes índices de refracción, se puede medir la interfase entre dos materiales (por ejemplo, hueso y prótesis) (63).

Para medir la masa ósea in vivo, se emplean técnicas de imagen que permiten cuantificar parámetros geométricos que predicen la respuesta del hueso al ser sometido a cargas. Es más difícil evaluar las características del hueso a nivel de microescala que a nivel de macroescala; al igual que es más difícil predecir el comportamiento del hueso esponjoso que el del hueso cortical. Mientras en el segundo se emplean medidas geométricas como el área de sección transversal, en el primero por su arquitectura más compleja con un trabeculado de espacios variados, la masa ósea se mide en volúmenes pequeños y homogéneos, y se representa una fracción del volumen aparente de hueso presente en un volumen total (46,64).

Dichas técnicas de imagen son la correlación digital de imagen (DIC) y la correlación digital de volumen (DVC). La correlación digital de imagen, desarrollada en la década de los 80, se trata de un método no invasivo que se efectúa a través del estudio de imágenes superpuestas en dos dimensiones (65). La correlación digital de volumen, propuesta por Bay et al. en 1999, consta de un estudio en tres dimensiones, extensión del estudio en dos dimensiones, muy útil en el estudio de la deformación en el hueso trabecular (66). Una vertiente de esta técnica de imagen que permite ver la microarquitectura ósea y la densidad volumétrica de hueso, es la High-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT). Este sistema, comercializado en la mitad de los 2000 y que emplea una cantidad muy baja de radiación, se usa principalmente para el diagnóstico y tratamiento de la osteoporosis (67,68).

1.3.2- REGENERACIÓN ÓSEA

1.3.2.1- Descripción y Conceptos clave en Regeneración Ósea

La regeneración ósea consiste en la restauración completa, morfológica y funcional, sin permanencia de cicatriz, de hueso que se ha perdido por diversas causas. Como es sabido, el hueso tiene la capacidad intrínseca de regenerar su arquitectura y función fisiológicamente, pero existen situaciones clínicas en las que dicha capacidad se ve limitada y se requiere una regeneración reparativa. Este es el caso de grandes defectos óseos, provocados por fracturas complejas, la resección de grandes tumores, osteomielitis severas, o defectos congénitos. Por otra parte, existen enfermedades sistémicas que comprometen esta capacidad regenerativa del hueso, como son las necrosis avasculares, las pseudoartrosis atróficas, o las osteoporosis graves (69,70).

Entre los métodos y técnicas que existen para incrementar la capacidad de regeneración ósea figuran la distracción y transporte óseo, la aplicación de injertos óseos osteoconductores (autólogos, xenoinjertos o aloinjertos), el uso de factores osteoinductores, la técnica de reconstrucción en dos tiempos de Masquelet para la reparación de huesos largos. También existen métodos no invasivos que pueden fomentar la regeneración ósea como la aplicación de ultrasonidos o de campos electromagnéticos. Como agentes sistémicos para la mejora de la regeneración en ciertas patologías figuran la hormona de crecimiento (GH), análogos de la hormona paratiroidea (PTH) y medicamentos antirreabsortivos como los bisfosfonatos (71,72). Los bisfosfonatos intravenosos se emplean para el tratamiento de metástasis procedentes de tumores sólidos, como en el caso del cáncer de mama, de próstata o de pulmón. También se administran para tratar el mieloma múltiple o la hipercalcemia maligna. Los bisfosfonatos por vía oral, en cambio, se emplean para el tratamiento de la osteoporosis y osteopenia con mayor frecuencia, aunque en ocasiones también en el caso de Enfermedad de Paget y osteogénesis imperfecta (73–75). El denosumab, perteneciente al grupo de anticuerpos monoclonales, actúa inhibiendo las funciones de los osteoclastos en la reabsorción ósea ya que se une al receptor

RANK-L. Tanto los bisfosfonatos como el denosumab, están relacionados con la osteonecrosis de los maxilares (76).

Para que tenga lugar la regeneración ósea son necesarios cinco factores indispensables. A este concepto, introducido por Giannoudis et al. en 2007, se le denomina “concepto de diamante” (77). En él se contempla que para que tenga lugar la regeneración ósea es imprescindible la presencia de células con potencial osteogénico, factores de crecimiento (BMP), una matriz o sustrato que sirva de soporte estructural, un entorno biomecánico adecuado y una correcta vascularización local.

Tan pronto se introduce un material, su superficie presenta proteínas absorbidas, que forman una monocapa recubriendo su superficie. Esta adsorción proteica depende de las cargas de la superficie del material. La unión entre las proteínas y el material es irreversible, y es el paso indispensable para la posterior actuación celular. Estas células que poseen el mecanismo de adhesión mediado por integrinas, unas proteínas de membrana que actúan como receptores para las moléculas de adhesión (osteopontina, fibronectina, vitronectina, etc.), son los leucocitos, los macrófagos, los fibroblastos, los osteoblastos y las células endoteliales (78). Los tejidos vascularizados presentan una reacción inflamatoria ante la agresión local para atenuar o neutralizar el agente lesional. Esta reacción puede llevar a la regeneración del tejido. Los fenómenos que se producen, derivados de la reacción vascular, conllevan a la acumulación de leucocitos y macrófagos, la proliferación de fibroblastos y precursores de células parenquimatosas. Sobre ellos actúan mediadores enzimáticos plasmáticos (del complemento, de la coagulación, fibrinolíticos y de las quininas) y mediadores procedentes de plaquetas, células cebadas y células basófilas. Esta respuesta inflamatoria se ve ligeramente modificada en presencia de un biomaterial a causa de la composición química y textura de superficie del mismo (79).

Para entender la regeneración ósea, es necesario describir previamente los siguientes conceptos clave en regeneración ósea:

- **Osteoinducción:** Proceso que propicia la mitogénesis de células mesenquimales indiferenciadas hacia la formación de células osteoprogenitoras con capacidad de formar hueso nuevo (80).

En ocasiones también se define como la producción heterotópica o ectópica de hueso, es decir, en localizaciones donde no suele haberlo. Esto se produce por la multiplicación y diferenciación fenotípica de células mesenquimales (MSCs) en células osteoprogenitoras o proosteoblastos a causa del estímulo de factores de crecimiento, que serán descritos en el apartado de ingeniería tisular.

- **Osteogénesis:** Consiste en la formación de hueso a través de la diferenciación celular de las MSCs hacia células del linaje osteogénico (proosteoblastos), que darán lugar a osteoblastos que sintetizan la sustancia osteoide, quedando englobados en la misma para diferenciarse, posteriormente, en osteocitos (81). Las MSCs pueden estar contenidas en el material de injerto óseo. Éstas células se denominan células troncales, pues según la molécula de señalización que reciban en su membrana, podrán diferenciarse hacia otro linaje celular como adipocitos, miocitos, tenocitos o condrocitos; que formarán grasa, músculo, tendones o cartílago, respectivamente (82). El éxito de esta formación ósea depende de la cantidad de MSCs presentes, existen evidencias de que la vascularización aporta nuevas MSCs de origen perivascular (83).

- **Osteoconducción:** Se define como la capacidad que tiene un material para permitir el crecimiento óseo en su superficie. Dicho material actúa como andamiaje orientando la formación y crecimiento tridimensional de nuevos vasos sanguíneos y sistemas de Havers, sirviendo así de matriz para la proliferación de células con capacidad regenerativa. En este caso, se produce la formación de hueso de forma ortotópica, en las proximidades del hueso (84). Es complemento de la osteoinducción y de la osteogénesis.

- **Osteointegración:** Concepto descrito a partir de los trabajos publicados a finales de la década de los 60 y durante la

década de los 70 por Branemark en Suecia y por Schroeder en Suiza; consiste en la aposición directa de hueso en la superficie del material (en este caso, implantes de titanio) (85). En términos biomecánicos, se puede emplear para cualquier material, cementado o no, que presente o no tejido fibroso, y que muestre estabilidad frente a esfuerzos de rango fisiológico tanto in vitro como in vivo (86).

- **Encapsulación:** Cuando se introduce un material inerte, no tóxico, bien tolerado en el cuerpo, entre la 6ª a 12ª semanas, se forma en torno a él un tejido fibroso denso que lo encapsula. De este modo lo aísla. Histológicamente, la cápsula fibrosa tiene un espesor de entre 20 y 200 μm , en la que se observan pocos fibroblastos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas en una gran cantidad de fibras de colágeno tipo I orientadas paralelamente a la superficie del implante. A largo plazo se produce una cronificación del proceso, una inflamación suspendida o quiescente. En esta situación se observa un líquido pseudosinovial entre la capa fibrosa y la superficie del implante (86).

- **Osteoposición:** Tiene lugar cuando el tejido se deposita directamente, sin interposición de cápsula sobre un material bioinerte, formándose una interfaz entre los mismos (87).

- **Osteodistracción:** Se basa en provocar una fractura y separar los fragmentos con instrumentos denominados osteodistractores, que son los que estirarán el coágulo de fibrina y se promoverá así la formación de un puente óseo entre los fragmentos (88).

1.3.2.2- Reacciones Biológicas Patológicas en la Regeneración Ósea con Biomateriales

En ocasiones, la reacción inflamatoria básica que precede a la aposición directa del tejido sobre el material, o bien la encapsulación del mismo, no tienen lugar; produciéndose alteraciones en la respuesta

local básica. Estas reacciones biológicas pueden ser a nivel local, regional o general.

A nivel local, la respuesta más frecuente es la osteolisis. Ésta es una reacción local que se produce cuando existe alguna alteración de la respuesta interfacial típica. Existen diversos factores que pueden desencadenar el proceso de osteolisis, el más frecuente es la movilidad del implante en rangos superiores al habitual provocando que se rompa la interfaz entre la cápsula fibrosa y las trabéculas óseas, formándose hematomas que dan lugar un tejido de granulación que cada vez separa más el material del tejido fibroso. La inestabilidad mecánica derivada produce movimientos del material que conllevan a la liberación de partículas que alteran notablemente la composición histológica de la interfaz. En estos tejidos hay presencia del material (polietileno, cemento, aleaciones...), células (macrófagos, células gigantes, osteoclastos y osteoblastos), mediadores (prostaglandinas PGE-2, interleuquinas IL-1 e IL-6, y factor de necrosis tumoral, TNF-1). Las partículas de menor tamaño son fagocitadas por macrófagos, que a su vez regulan los procesos inflamatorios y ejercen una acción directa sobre el hueso (el acoplamiento entre osteoblastos y osteoclastos). Las partículas de mayor tamaño no pueden ser fagocitadas por leucocitos y macrófagos, por lo que son transportadas por vía linfática a los grupos ganglionares correspondientes. Otro factor que puede provocar osteolisis y, a su vez el más temido, es la infección. La contaminación por gérmenes del material puede llevar a la retirada del mismo (89).

En la zona adyacente a un implante, se observa una rarefacción ósea como consecuencia de la diferencia entre las propiedades mecánicas que presentan el material y el hueso. A esta región se le denominó zona de liberación de tensiones (“stress-by-pass”) o de protección de tensiones (“stress shielding”). A este proceso de reabsorción ósea regional de origen mecánico, también se le denomina osteopenia adaptativa. Se sabe que esta osteopenia regional puede provocar fracturas periprotésicas a causa de una osteolisis agresiva, aunque esta situación es infrecuente (90).

Las reacciones generales son consecuencia de la liberación de partículas o iones al torrente sanguíneo derivados de la desintegración del material. Las más importantes son la carcinogénesis y la sensibilización. En lo que respecta a la primera situación, se han producido neoplasias de carácter esporádico con el empleo de superficies articulantes metal-metal. Los sarcomas son el tumor más frecuente, y las aleaciones cobalto son las que presentan mayor actividad carcinogénica. Sin embargo, el carácter de los mismos es esporádico y no se establece una relación etiológica. El fenómeno de sensibilización ante la exposición a metales, en cambio, se presenta con relativa frecuencia. Su incidencia es mayor en el sexo femenino. Los elementos que la producen con mayor frecuencia son el níquel, el cobalto, el cromo y el vanadio. Por otro lado, el aluminio, el titanio y el molibdeno no tienen capacidad inmunogénica. La respuesta más frecuente es la hipersensibilidad diferida de tipo IV. Los síntomas locales generalmente son locales (dolor, edema) o generales (eczema, urticaria, broncoespasmo). Por tanto, se recomienda evitar materiales como el acero inoxidable, o aleaciones de cromo-cobalto que contienen níquel (91).

1.3.2.3- Regeneración Ósea en Cirugía Oral

En la odontología se presentan habitualmente situaciones clínicas en las que el paciente ha perdido hueso; bien por causas infecciosas, bien por causas fisiológicas; en las cuales es necesario además de eliminar el factor causal, realizar técnicas que faciliten la recuperación del tejido óseo.

En la especialidad de endodoncia, cuando tras un tratamiento de conductos se presenta una reinfección o la curación del proceso apical es incompleta y permanece sintomatología o la pérdida ósea aumenta, se realiza una cirugía apical. A través de esta técnica, se accede directamente al ápice del diente para limpiar dicha zona y conseguir una obturación retrógrada hermética con materiales como el agregado trióxido mineral (MTA). En ocasiones este tratamiento se combina con

la colocación de un injerto o sustituto óseo para favorecer la cicatrización y recuperación del hueso perdido por el proceso infeccioso (92).

En periodoncia, son frecuentes las técnicas regenerativas para el mantenimiento de dientes que presentan defectos óseos verticales en el hueso circundante e implantes afectados por periimplantitis (23,93).

En el ámbito de la cirugía oral y maxilofacial, también existen situaciones en las que se requiere mayor cantidad de hueso. Para realizar una reposición con implantes en pacientes total y parcialmente desdentados con el fin de restaurar la estética y función de los mismos, es necesario disponer de una cantidad de hueso suficiente en anchura y en altura. Gran parte de los defectos presentes en la cresta alveolar necesitan de regeneración ósea para un posterior tratamiento con implantes que restaure la estética y función del paciente. Entre las causas de esta pérdida ósea figuran la enfermedad periodontal, la reabsorción de hueso alveolar postextracción, la pérdida ósea en torno a implantes... (94,95)

Las diversas opciones que existen para favorecer la formación de hueso en estos casos son el empleo de injertos autólogos para el aumento vertical y lateral de cresta, técnicas de distracción alveolar u osteogénesis de distracción, la elevación del suelo sinusal, la osteoinducción con el empleo de factores de crecimiento, la transferencia de células madre o progenitoras que se diferencian en osteoblastos, la regeneración ósea guiada con membrana de barrera y sustitutos óseos, el empleo de plasma rico en plaquetas (PRP) o plaquetas ricas en fibrina (PRF) (72,96–99)

1.3.2.3.1- Regeneración Tisular Guiada (RTG) y Regeneración Ósea Guiada (ROG)

La regeneración tisular guiada (RTG) es una técnica basada en la utilización de una membrana barrera para crear un espacio aislado que facilite la proliferación de las células angiogénicas y osteogénicas desde el espacio medular hasta el defecto. De este modo se evita la interferencia de los fibroblastos provenientes del tejido conectivo adyacente al defecto (100).

Los primeros estudios en emplear la membrana barrera fueron realizados por Nyman y cols. en la década de los 80 (101). Es a partir de entonces cuando se extiende el uso de las membranas inertes de politetrafluoreetano expandido (PTFEe). Estas membranas requerían de una segunda intervención para ser retiradas, y a causa de su difícil manipulación por su carácter hidrofóbico, necesitaban ser fijadas con elementos como minitornillos.

Era frecuente que con el empleo de la técnica de RTG se produjesen problemas de colapso de las membranas, lo que conllevaba a una formación deficiente de hueso en cantidad y calidad. A partir de entonces se recomendó el uso de materiales de relleno óseo para el soporte de la membrana y evitar por tanto su colapso. Con esta técnica, a la que se denominó regeneración ósea guiada (ROG), se pretendía activar la regeneración ósea mediante los potenciales osteogénico, osteoinductor u osteoconductor; lo que le proporcionaba mayor predictibilidad en los resultados clínicos. Actualmente es el estándar en la regeneración de defectos óseos en implantología oral (99). Esta técnica tampoco estaba exenta de complicaciones, pues se producía la exposición de la membrana con frecuencia, lo que alteraba los resultados clínicos. Por ello, en la década de los 90, se extendió el uso de membranas biorreabsorbibles. Estas membranas, confeccionadas con polímeros como el ácido poliglicólico o poliláctico, u obtenidas de origen animal, permitían reducir los períodos de cicatrización, las complicaciones eran escasas y la morbilidad para el paciente era inferior, ya que se reducía el número de intervenciones (102,103).

1.3.2.3.2- Biología de la Reparación Ósea en Regeneración Ósea Guiada

La cicatrización de un defecto óseo de forma natural, es decir, sin la colocación de una membrana de barrera, de un sustituto o injerto óseo, o de ambos; se produce en dos meses. Cuando se emplea un injerto o sustituto óseo, para que se produzca la remodelación de hueso es muy importante que exista un contacto inicial entre éste y el injerto, pues el paso de unidades de remodelación de uno a otro es de pocos milímetros, por ello, es necesaria una correcta compactación de las partículas y fijación del injerto. La reparación comienza en los márgenes del defecto y, una vez completado dicho período de dos meses, no progresa, pero sí alcanza un aumento leve de densidad a los 4 meses.

Con el uso de membrana barrera se produce la separación del defecto en dos compartimentos. El compartimento externo se sitúa en la zona de la membrana en contacto con el tejido blando; y el compartimento interno se sitúa en lo que corresponde a la cavidad medular. En el espacio interno se forma un hematoma que es infiltrado por tejido de coagulación, simultáneamente, se produce la aparición de nuevos vasos sanguíneos que aportan células mesenquimales con capacidad de diferenciación osteogénica. De las superficies del defecto emerge hueso amorfo formado por los osteoblastos provenientes de la proliferación y diferenciación de las células osteogénicas por acción de citoquinas y otros factores de crecimiento. Este proceso se denomina “activación ósea”. A los tres meses de la creación del defecto, se produce la transformación del hueso amorfo en hueso cortical, que se encuentra en las inmediaciones de las paredes, y en hueso esponjoso, situado en el centro del defecto. Durante el cuarto mes el hueso pasa a su última fase de maduración, el remodelado haversiano, que comienza en los márgenes del defecto para progresar hacia la porción central. Los osteones primarios y secundarios se encuentran separados por la línea cemental. A partir del cuarto mes y hasta el sexto, continúa el crecimiento y modelado del hueso estimulados por las cargas mecánicas; aumenta la densidad ósea, se produce la restauración del periostio y endostio y se incrementa el número de vasos sanguíneos.

Este proceso de remodelación finaliza al año. En lo que respecta al compartimento de tejido blando, si la membrana es porosa, puede ser invadida por el mismo. Se sabe que las membranas poseen propiedades osteoinductoras (100).

Cuando se emplea un injerto para favorecer el crecimiento óseo, se produce un proceso biológico denominado “incorporación”. Durante el mismo, dicho material se une al tejido de modo que comparten estructura y fisiología, es decir, el conjunto funciona como un todo biomecánicamente. El proceso de incorporación puede verse favorecido por la presencia de osteoblastos o factores de crecimiento presentes en el material de injerto óseo. Su secuencia es similar a la mencionada con anterioridad, a diferencia de que a partir de la tercera semana y hasta el tercer mes se combinan aposición ósea de hueso neoformado por los osteoblastos y reabsorción ósea de hueso necrosado del injerto por los osteoclastos. Una vez transcurrido el año, hay continuidad en la dirección de las trabéculas con el lecho receptor; también se observa corticalización del hueso esponjoso (15).

El proceso de incorporación es diferente según el tipo de injerto que se emplee. Cuando se trata de injertos autólogos corticales no vascularizados, la invasión angiogénica se ve dificultada, necesita previamente una reabsorción osteoclástica para ensanchar los canales de Volkmann y Havers (“the creeping substitution” (104)). Esta reabsorción osteoclástica se evita con los injertos autólogos corticales vascularizados si se produce una correcta y rápida anastomosis quirúrgica (por ejemplo, los injertos libres de peroné). Cuando se emplean aloinjertos, las células inflamatorias y los nuevos vasos sanguíneos están expuestos a antígenos, por lo que se produce una respuesta celular que, aunque sea leve, produce una alteración en la diferenciación y proliferación de las células mesenquimales. Para que se produzca la unión del tejido al injerto, hay una fase previa de reabsorción osteoclástica, y posteriormente, las células endostales procedentes de la cavidad medular son responsables de dicha unión. En el caso del aloinjerto esponjoso, empleado generalmente para el relleno de cavidades, se observan tres zonas diferenciadas. La zona central,

posee trabéculas necrosadas, tejido fibroso e infiltrado inflamatorio; en la zona intermedia, existen zonas de hueso trabecular viable y osteoide con células gigantes; en la periferia, el hueso se observa con aspecto normal y espacios medulares que contienen células viables en un porcentaje elevado (105).

1.3.2.4- Estrategias de futuro para mejorar la regeneración ósea (Ingeniería Tisular)

En la actualidad, la investigación en la regeneración ósea se orienta hacia la formación ósea más rápida, buscando obtener un hueso de mayor calidad y en mayor cantidad. Uno de los principios básicos de esta ciencia es la imitación de la biología o la biomimética, es decir, pretende favorecer la regeneración de tejidos del organismo añadiendo matrices y mediadores biológicos adecuados. Para ello son necesarios tres elementos clave: entramados conductores, moléculas de señalización y células.

Los inicios de la ingeniería de tejidos se remontan al descubrimiento de la proteína morfogenética ósea (BMP) por Marshall Urist en 1965 (80). Posteriormente, Henry Mankin, introdujo en 1983 la idea de la importancia del conocimiento celular para la mejora de las posibilidades terapéuticas. Pero no fue hasta 1995 cuando se definió por primera vez el concepto de “ingeniería tisular”. Vacanti lo describió entonces como un “campo interdisciplinar que aplica principios de biología e ingeniería para la creación de sustitutos destinados a la creación, restablecimiento o conservación de una función orgánica”. Posteriormente fueron propuestas otras definiciones: “Arte y ciencia de manipular compuestos sintéticos para fabricar estructuras anatómica y funcionalmente específicas que pueden incorporar células vivas, agentes bioactivos o ambos para reforzar o sustituir la fisiología de los tejidos receptores” (106). “Ciencia del diseño y fabricación de nuevos tejidos para el restablecimiento funcional de órganos alterados y la sustitución de estructuras dañadas por traumatismos y enfermedades” (107).

El potencial de regeneración de los tejidos depende, además de las células osteoprogenitoras indiferenciadas presentes en el mismo, numerosas en el embrión y escasas en el adulto, del ritmo de regeneración de cada tejido. El tejido óseo, presenta ritmos altos de regeneración.

Los componentes principales de la ingeniería de tejidos son las células progenitoras, los factores de crecimiento, y los biomateriales para la ingeniería de tejidos. Entre las células empleadas figuran las células madre mesenquimales (MSCs) y las células diferenciadas. Las células madre pueden diferenciarse en osteoblastos, células endoteliales, condroblastos, fibroblastos, etc. Es posible aislarlas de los tejidos hematopoyéticos y lipídicos mediante centrifugación o filtrado. Con las células madre se ha experimentado para regeneración y reparación de casi todos los tejidos del aparato locomotor, aunque su aplicación clínica no se ha consolidado aún. El empleo de células diferenciadas se ha estudiado para evitar los plazos de diferenciación de las células indiferenciadas, que son dependientes de factores locales. La obtención y transporte de células osteoblásticas autólogas es compleja y difícil y la posibilidad de multiplicarlas en cultivo manteniendo su capacidad de expresión fenotípica es muy reducida. Por el momento no se ha aplicado clínicamente. La aplicabilidad clínica se limita a la reparación cartilaginosa y de tendones y ligamentos. La primera por trasplante de condrocitos autólogos, y la segunda mediante la utilización de fibroblastos sembrados en mallas de colágena.

Los factores de crecimiento, descubiertos en la década de 1960, son polipéptidos que transmiten señales a las células para promover o prevenir la proliferación, adhesión, diferenciación y/o migración celular, modificando su actividad. Son producidos por diversos tipos de células, se encuentran en el plasma o en los tejidos y actúan sobre receptores específicos de membrana. Sus mecanismos de transporte para estimular a una determinada célula pueden ser tres, endocrino, cuando son secretados por una célula al torrente circulatorio hasta alcanzar la célula diana; paracrino, en caso de que sean liberados localmente y actúen sobre células vecinas; y autocrino, cuando

estimulan a la misma célula que los secretó. Existen más de 130 factores de crecimiento diferentes, pero las moléculas más importantes que producen la señalización en la membrana de las MSCs son las proteínas morfogenéticas óseas (PMOs o BMPs, en inglés). Estas glucoproteínas de bajo peso molecular están localizadas en diversos tejidos, pero sobre todo en la matriz ósea y en las plaquetas. Tienen capacidad inductiva en los procesos de cicatrización, promueven la reacción inflamatoria, la angiogénesis y la formación del callo óseo; semejándose a la formación de hueso endocondral. También tienen la capacidad de formar hueso ectópico. Se trata de citoquinas que pertenecen a la familia de los factores de crecimiento transformante-beta (TGF- β); existen más de 20, pero las que se emplean en traumatología con mayor frecuencia son las PMO-2, PMO-3, PMO-4 y PMO-7. La PMO-7 actúa de modo que las células madre mesenquimales se diferencien directamente a osteoblastos sin el paso intermedio por tejido cartilaginoso (no se produce una osificación endocondral como en el resto de situaciones) (108,109). Se sabe que una misma molécula puede actuar en ocasiones con efecto estimulador y por momentos con efecto inhibidor. Su uso por el momento se ve limitado por problemas de formación ectópica de hueso, producción de osteólisis, tener un coste elevado, su rápida degradación, la necesidad de dosis elevadas para que tenga efecto, producción de tumefacción en el tejido blando, la disminución de su efecto a medida que avanza la edad (los pacientes de edad avanzada tienen una población pobre de PMOs), etc. Las investigaciones se orientan a la búsqueda de un portador que permita la liberación de PMOs durante mayor tiempo en la zona a regenerar (110). En la actualidad, se considera el colágeno el mejor transportador de las BMPs. En el caso de las BMPs 2 y 7 fueron aprobadas para su uso clínico por la FDA en los años 2001 y 2002. Pueden ser empleadas solas o en combinación con injertos, células mesenquimales, factores angiogénicos, paratirina... Con su empleo se presentan problemas como determinar la dosificación adecuada tanto en cantidad total, como en ritmo y tiempo de la liberación del factor. Sus efectos pueden ser variables en función de la dosis, la célula diana, el grado de diferenciación, el contexto tisular... (111)

Otros factores de crecimiento osteoinductivos son los factores de crecimiento insulínicos (IGF-1, IGF-2), los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF), los factores de crecimiento plaquetarios (PDGF: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB), los factores de crecimiento epidérmicos (EGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). El IGF-1 es un mediador de la hormona de crecimiento, participando en la osificación endocondral del esqueleto. Su administración local produce formación en hueso membranoso y cartílago. El IGF-2 contribuye a la regulación del crecimiento fetal. Los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF), son un conjunto o familia de polipéptidos que estimulan la proliferación y regeneración de los endotelios vasculares, contribuyendo a la angiogénesis reparadora de todos los tejidos del aparato locomotor y cicatrización de heridas. Se han descrito más de 9 miembros, de los cuales los más relevantes son el FGF ácido y el FGF básico, este último presente en hueso, cerebro, hígado, retina y suprarrenales y macrófagos. Está demostrado que producen la estimulación en células de cultivo. Los factores de crecimiento plaquetarios intervienen en las fases tempranas de reparación tisular aumentando el infiltrado inflamatorio y estimulando la proliferación de células mesenquimales y la angiogénesis.

Se sabe que las plaquetas juegan un papel importante en la regeneración tisular tanto de tejidos blandos como duros. El marco regulatorio del uso terapéutico no sustitutivo del plasma autógeno y sus fracciones, componentes o derivados está regido por el artículo 5 de la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre, y por las disposiciones legales que rige dicha Directiva en nuestro país, según aparece reflejado en el Informe/V1/23052013 de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. El plasma rico en plaquetas consiste en una suspensión líquida inyectable de origen autólogo que contiene concentrado de plaquetas (P-PRP) o concentrado de plaquetas y leucocitos (L-PRP). En contacto con sustancias activadoras del proceso de coagulación como trombina, cloruro cálcico, batroxobina y otros, se convierten en una red de fibrina de consistencia gelatinosa que contiene los diferentes elementos celulares. El interés del empleo de este gel de plaquetas radica en dos

cuestiones. Por un lado, aporta una gran estabilidad en el relleno del defecto óseo, pues comporta como un excelente transportador de los injertos de hueso y ofrece la posibilidad de generar una malla de fibrina que puede ser suturada y que colabora a mantener la estabilidad del injerto. Por otro lado, las células sanguíneas, en especial las plaquetas contenidas en el PRP, son una fuente de sustancias mediadoras capaces de acelerar o mejorar los procesos regenerativos (112). Entre estas sustancias destacan diversos factores de crecimiento tales como TGF- β , PDGF, VEGF, EGF e IGF. Varios estudios demuestran la actividad de estas sustancias en la estimulación de la angiogénesis, en la inducción de la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de células progenitoras y en la síntesis de colágeno. A pesar de las ventajas mencionadas, las revisiones bibliográficas obtienen resultados heterogéneos. Parece que el uso de plasma rico en plaquetas provoca efectos beneficiosos tanto clínicos como radiográficos en la regeneración de defectos óseos, pero recomiendan su empleo como transportador y complemento de materiales de injerto óseo (113,114). Por otro lado, la fibrina rica en plaquetas pura (P-PRF) y la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) son biomateriales de fibrina sólidos, sin y con leucocitos, respectivamente. Puede ser natural (L-PRF) o artificial (P-PRF), pero en ambas técnicas la activación de las plaquetas se produce sin la adición de sustancias activadoras, dando lugar a una estructura de fibrina fuerte, lo que facilita la técnica de obtención. El L-PRF una gran cantidad de plaquetas y leucocitos, así como de factores de crecimiento tales como PDGF, VEGF y TGF, y cuotas muy representativas de fibrina, fibronectina y vitronectina. Para obtener estos materiales, es necesario realizar una extracción sanguínea al paciente, recolectarla en tubos y centrifugarla a 3000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se separa el coágulo de fibrina del plasma acelular y de los eritrocitos. Se emplean frecuentemente en especialidades como cirugía oral y periodoncia, además de cirugía plástica, otorrinolaringología y medicina deportiva. Pueden ser empleados solos o en combinación con sustitutos óseos (115).

Por último, el papel de los biomateriales en la ingeniería de tejidos es ejercer de andamios, sustratos, estructuras, armazones, soportes o matrices, y servir de plataforma de anclaje para la adhesión y retención

de las células utilizadas. También transportar, almacenar y liberar los factores activos, estimular las respuestas celulares específicas y contribuir a la integridad estructural y mecánica de la región tratada. Es necesario que estos materiales integren espacios porosos para albergar células y polipéptidos, para favorecer la penetración o bioconductividad del tejido neoformado o regenerado. Se considera que el tamaño óptimo de poro oscila entre 200 y 400 micras, porque es el tamaño que favorece la invasión de brotes capilares. Para cumplir con los requerimientos biomecánicos y biomiméticos, es necesaria una disposición macroestructural que debe imitar las características de los tejidos a los que reemplazan, para evitar la protección de cargas (“stress shielding”). También deben ser biodegradables y tener un ritmo de degradación en sintonía con el ritmo de regeneración y extensión del tejido neoformado. Tanto su composición química como la de los productos de desecho debe ser biocompatible y carecer de toxicidad. Es recomendable que sean bioactivos, es decir, que ejerzan una interacción positiva sobre las células. Deben ser implantados con las garantías deseables de esterilidad, y el almacenamiento prologando hasta su utilización no debe acompañarse de un deterioro de las propiedades físicas y químicas del sustrato. Los biomateriales empleados para regeneración ósea serán extensamente descritos en el siguiente apartado.

1.3.3- INTRODUCCIÓN A LOS BIOMATERIALES

Se denomina biomaterial a aquel material implantable en un organismo vivo, que se fabrica a partir de componentes naturales o artificiales. Su finalidad es reparar o remplazar un tejido dañado, ya sea duro o blando; para reproducir la función de los tejidos vivos en los sistemas biológicos. Por tanto, la biocompatibilidad debe ser una característica intrínseca de los mismos; es decir, deben ser biológicamente compatibles y no provocar ninguna alteración patológica o efecto adverso, ya sea local o sistémico, en el organismo en el que son implantados. Incluso es deseable que genere la respuesta celular más apropiada y beneficiosa. Los biomateriales pueden ser implantados en el cuerpo de manera temporal o permanentemente (116).

Los requisitos que debe poseer cualquier biomaterial (117), además de la biocompatibilidad ya mencionada, son:

- No ser tóxico ni cancerígeno.
- Ser químicamente estable o biodegradable en productos no tóxicos.
- Poseer propiedades mecánicas apropiadas, similares al tejido que reemplazan (resistencia, tiempo de fatiga, peso, características de superficie...).
- Poseer un diseño, tamaño y forma adecuados.
- Tener un bajo coste económico.
- Que la fabricación y procesamiento sean reproducibles y fiables.

Los biomateriales se pueden clasificar en función de su comportamiento una vez implantados en un organismo vivo, el tiempo durante el cual mantienen su funcionalidad y su origen. Con respecto a su comportamiento, pueden ser **bioactivos** o **bioinertes**. Un material posee la propiedad de bioactividad cuando posibilita una respuesta biológica en su interfaz de manera que favorece la formación de un enlace entre los tejidos y dicho material (118). Un ejemplo de material bioactivo es la hidroxiapatita. Por otra parte, un material bioinerte es

aquel que, a pesar de tener un contacto directo con el tejido adyacente, su influencia es prácticamente nula en el mismo. Su cinética de reacción es muy lenta, no se producen reacciones químicas entre el implante y el tejido. Un ejemplo es el titanio. En caso de no existir una unión directa entre el material y el tejido vivo, dicho material permanece encapsulado por tejido fibroso, pasando a comportarse y denominarse como biotolerante (como ejemplo se puede mencionar el acero inoxidable) (119).

Según el tiempo que mantienen su funcionalidad, los biomateriales se clasifican en **biodegradables/reabsorbibles** o **bioestables**. La biodegradación, según la Sociedad Europea de Biomateriales (1991), consiste en la destrucción gradual de un material mediada por el sistema biológico que simplemente actúa como medio en el que tiene lugar, no como responsable de dicha degradación. Este proceso implica la curación óptima del tejido, con la restauración de las funciones fisiológicas. La situación idónea de regeneración sería aquella en la que un biomaterial es degradado y reemplazado por el propio huésped a medida que este forma nuevo tejido con estructura similar a la nativa. Estos materiales pierden previamente sus propiedades mecánicas y posteriormente su masa a través de procesos de bioasimilación, disolución, migración o solubilización. En estos materiales es necesario que tanto los productos de partida como los productos de degradación sean inocuos (no mutagénicos, carcinogénicos, antigénicos, tóxicos o teratógenos) y no interfieran en el proceso de regeneración de los tejidos. Lo ideal es que se produzca una transferencia gradual de función, a medida que el tejido vivo se recupera, el implante se degrade gradualmente. El ejemplo más significativo de material biodegradable son las suturas. Los materiales bioestables permanecen en el organismo sin sufrir apenas modificaciones en su estructura y propiedades, es decir, permanecen inertes sin evidencia de reacciones adversas in vivo. Son ejemplo de materiales bioestables los dispositivos de fijación ósea (grapas, tornillos, placas...) y la alúmina (120).

Según su origen, los biomateriales se dividen en **naturales** o **sintéticos**. Para seleccionar un material de origen biológico es necesario

comprobar mediante estudios y ensayos “in vitro” e “in vivo” que tengan un comportamiento mecánico reproducible y similar al de los tejidos vivos. Estos materiales se obtienen a partir de la selección y limpieza del tejido. Posteriormente se procede a su procesamiento y caracterización, y a la estabilización mediante químicos (como el glutaraldehído, por ejemplo) o métodos físicos alternativos. Generalmente, se emplean macromoléculas procedentes de tejido conectivo, como es el colágeno. Algunos de los usos de los materiales naturales son la realización de piel sintética, ligamentos o tendones, prótesis vasculares, prótesis cardíacas, sistemas de dispensación de fármacos...

Los biomateriales sintéticos también han sido ampliamente utilizados en el campo de la medicina y odontología para remplazar estructuras en el ser humano, entre otros. Entre los materiales sintéticos más empleados se encuentran los metales, los biomateriales poliméricos y las cerámicas.

Los biomateriales metálicos, han sido ampliamente usados en medicina para el reemplazo de articulaciones, para fijaciones ortopédicas, como implantes dentales y stents. El oro ya se empleaba en los Siglos II y I a.C. para realizar suturas. La primera aleación utilizada en el cuerpo humano fue el vanadio. Actualmente se emplean alrededor de 12 metales pertenecientes al sistema periódico, que corresponden a los metales preciosos. Es necesario tener en cuenta la tolerancia por parte del organismo a los mismos, es decir, la dosis que el organismo pueda tolerar. Los aceros inoxidables se emplean como biomateriales osteoarticulares: clavos intramedulares, tornillos y placas de osteosíntesis ya que no presentan problemas de alergia. El más común es el Acero 316L, compuesto por un 65% de Fe, entre el 17 y 20% de Cr, entre el 10 y el 17% de Ni, entre el 2 y 4 de Mo, y un 0.03% de C. Su módulo elástico es de 200 GPa. Las aleaciones de Cr-Co se emplean en odontología para la realización de prótesis (CrCoMo) o para la fabricación de vástagos de prótesis que soportan grandes cargas (cadera) (CoNiCrMo) (121–123). Las aleaciones de Ti, material introducido en 1951 por Leventhal, tienen la ventaja de poseer unas buenas propiedades mecánicas y electroquímicas, además de su

excelente biocompatibilidad y elevada resistencia a la corrosión, pues se forma una capa de óxido, compacta y adherente, que pasiva el material (124).

Los problemas asociados al empleo de biomateriales metálicos son el desgaste y la corrosión de los materiales por el contacto en las superficies articulares, lo que provoca la formación de partículas, que pueden provocar toxicidad y osteolitis. La remodelación ósea puede verse afectada a causa del sometimiento del hueso a carga por parte del implante. Si el implante es excesivamente rígido (presenta un elevado módulo elástico), absorbe la mayor parte de las cargas dejando al hueso sin carga, lo que provoca su atrofia por desuso. En la situación contraria, una sobrecarga en el tejido óseo conllevaría a un proceso de osteolitis. Las propiedades que debe poseer un biomaterial metálico ideal son: una excelente biocompatibilidad; un módulo elástico lo más similar al que posee el hueso, que oscila entre 10 y 40 GPa; una elevada resistencia a la corrosión y al desgaste y una adecuada resistencia para soportar el sometimiento a cargas cíclicas (125).

El segundo grupo de biomateriales sintéticos más empleado es el de los biomateriales poliméricos. Se emplean en clínica con frecuencia y en variedad de compuestos y formas. Pueden ser de origen sintético o natural, bioestables o biodegradables. Los polímeros biodegradables contienen grupos funcionales sensibles a procesos hidrolíticos (éster, carbonato, anhídrido, uretano, ortoéster o amida). Son ejemplo de estos polímeros las suturas reabsorbibles sintéticas, confeccionadas con poliácido glicólico (PGA), copolímeros poliácido glicólico/poliácido láctico (PGA/PLA: Vicryl), polidioxanona (PDS), poliácido-glicólico-co-trimetilencarbonato (126). Entre ellos destacan los *cementos acrílicos*, que se emplean para asegurar la fijación de la prótesis al hueso, transmitir las cargas a la prótesis, compensar imperfecciones... Sus componentes son un polímero que se presenta en forma de polvo (polimetilmetacrilato -PMMA-, sulfato de bario, peróxido de benzoilo) y un monómero como líquido (metilmetacrilato -MMA-, agentes antioxidantes y NN-dimetilparatomidina). Una vez comenzada la reacción de polimerización, no puede detenerse. Ésta es dependiente de

la temperatura ambiente (a menor temperatura enlentece y se produce más rápidamente a medida que ésta aumenta). En su utilización hay que tener en cuenta tres fases: la fase de mezcla, la fase de trabajo (que suele durar entre 4 y 5 minutos y es en la que se posiciona el cemento en el hueso) y la fase de endurecimiento (que dura entre 7 y 9 minutos desde el comienzo de la mezcla). El grosor de capa que se debe emplear no está estipulado, aunque habitualmente es de 4 mm. Los problemas asociados a su uso están relacionados con el aumento de la temperatura (puede alcanzar hasta los 133 °C), lo que puede provocar citotoxicidad. El monómero puede ser responsable de muerte celular por solubilidad de la membrana a causa de su afinidad por las lipoproteínas; también están asociadas a su uso complicaciones provocadas por la liberación de partículas del cemento, éstas provocan la producción de la interleukina-1, el factor de necrosis tumoral, la prostaglandina E2, la Interleukina-6 y la calcitonina, sustancias involucradas en la reabsorción ósea (127). Por otra parte, la contracción de polimerización provoca desajustes que conllevan a una micromovilidad de la prótesis.

El *polietileno* es un material formado por cadenas de repetición de moléculas de elevado peso molecular unidas por enlaces covalentes, se interpone en la superficie articular de los elementos protésicos para favorecer el deslizamiento de ambas superficies (128). Tiene el inconveniente de que se desgasta, lo que conlleva al desajuste de la prótesis y a una posible osteomielitis, por lo que se puede emplear en combinación con metales o cerámicas. Existen estudios en los que se indica que el desgaste es menor cuando se articula con cerámicas (14).

Los hidrogeles son redes capaces de absorber una cantidad significativa de agua (>20% de su peso) sin disolverse o perder su integridad estructural. Son materiales hidrofílicos insolubles en agua, pero aumentan su volumen en presencia de la misma manteniendo su forma, tienen un tacto suave y una consistencia elástica. Entre sus aplicaciones destacan los implantes basados en ácido hialurónico como andamiaje de células y vasos sanguíneos en la regeneración de lesiones cerebrales (130).

Las cerámicas se definen como componentes sólidos que se forman por la aplicación de calor, o bien presión y calor; comprenden al menos dos elementos que pueden ser sólidos metálicos o no metálicos, unidos principalmente por enlaces iónicos y/o covalentes (131). Poseen un alto módulo de Young, por lo que son rígidas y quebradizas y tienen una baja resistencia a la tracción. Su resistencia a la compresión, a la corrosión y al desgaste es elevada. Las cerámicas son duras, por lo que también ofrecen resistencia a la penetración. Tienen una alta tensión superficial, y al ser hidrófilas, poseen un alto grado de humectación por su capacidad de absorber agua. Se pueden clasificar en bioinertes (alúmina, zirconio), bioactivas o de superficie bioactiva (HA) o reabsorbibles (α -TCP, β -TCP).

En medicina, se emplean cerámicas a base de fosfatos cálcicos, alúmina, sílice, zirconio y dióxido de titanio. A estas cerámicas se les denomina biocerámicas (132). Las aplicaciones son diversas. Una de ellas es la fabricación de superficies de deslizamiento en prótesis de cadera debido a su escaso desgaste que apenas conlleva producción de partículas que produzcan osteomielitis (133,134). Esto se debe a las propiedades de las cerámicas anteriormente mencionadas y a la disposición de una capa proteica sobre las superficies de deslizamiento que proporciona una mayor lubricación. Para esta aplicación se emplean cerámicas bioinertes como las derivadas del óxido de alúmina (Al_2O_3) o el óxido de zirconio (ZrO_2). También se utilizan como recubrimientos confiriendo a los implantes metálicos la capacidad de osteointegrarse sin interposición de tejido fibroso (135).

En odontología, tienen aplicaciones importantes sobre todo en el ámbito de la prostodoncia para confeccionar prótesis que sustituyan dientes ausentes (prótesis fija dentosoportada) o para reconstruir parte de los mismos (inlays, onlays, carillas, coronas de recubrimiento parcial y total, etc.). Las cerámicas que se utilizan son de fase vítrea, de fase cristalina, y en último lugar, los composites con matriz de resina. En el grupo de las cerámicas vítreas están las cerámicas feldespáticas, formadas a partir de materias primas naturales como el feldespato, el cuarzo y la arcilla caolín; y las cerámicas denominadas avanzadas, que

se sintetizan a partir de materias primas sintéticas como las basadas en leucita, fluorapatita, o disilicato de litio. En el grupo de las cerámicas de fase cristalina se encuentran aquellas formadas con alúmina y/o zirconio. La elección de unos materiales u otros depende de los requerimientos de la zona a restaurar: necesidad de estética, de resistencia mecánica, si va a emplearse sobre cofia metálica o de zirconio, etc. (136)

En la especialidad de endodoncia, es reciente el uso de las biocerámicas, en concreto el fosfato tricálcico, en la confección de cementos para obturación de conductos (EndoSequence BC sealer, Brasseler, USA, Savannah, GA) como sustitutos de los cementos de Zn-E, más irritantes para los tejidos periodontales. Este cemento sigue la normativa ISO 6876/2001 en lo que respecta a fluidez, solubilidad, radioopacidad. Los estudios demuestran su elevado poder antimicrobiano dado que su pH es mayor a 11. Por otra parte, también ha presentado una elevada citotoxicidad en las primeras 24 horas, que se reduce a las 6 semanas. Aunque asemeja que estos selladores de conductos pueden ofrecer grandes resultados, los resultados todavía son dispares (137).

Los cementos de fosfato cálcico también se emplean como protectores pulpares en las técnicas de recubrimiento pulpar directo, como alternativa a los cementos de Zn, ionómero de vidrio o hidróxido de calcio (138).

Su aplicación como sustitutos del tejido óseo, es de importancia debido a que son los materiales más parecidos al componente mineral del hueso y poseen una excelente biocompatibilidad y osteointegración, favoreciendo la adherencia celular y tisular. Las cerámicas utilizadas para dicha finalidad serán descritas en el apartado que trata sobre sustitutos para injertos óseos.

1.3.3.1- Injertos y sustitutos óseos

La pérdida de disponibilidad ósea es uno de los problemas más frecuentes en Cirugía Ortopédica y Traumatología, así como en Cirugía Oral y Maxilofacial y en Implantología. Por tanto, en estas situaciones se necesita una mayor cantidad y calidad óseas para recuperar la funcionalidad y, en ocasiones, la estética de los diferentes sistemas. En estas situaciones es necesario el empleo de materiales que ayuden a aumentar el volumen óseo, así como a estimular su crecimiento o regeneración.

1.3.3.1.1- Injertos Óseos

Los **injertos óseos autólogos** son los que se obtienen del propio paciente. Por tanto, en dicho paciente hay una zona donante y una zona receptora del injerto, lo que conlleva la realización de una doble cirugía. Los injertos autólogos son los más documentados y el “patrón de oro” de los injertos óseos, pues reúnen todas las propiedades de un biomaterial ideal: son osteoinductivos, ya que poseen factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas óseas, aunque en pequeñas cantidades; son osteogénicos por contener células osteoprogenitoras y mesenquimales, de las que sobreviven alrededor del 15%. También son osteoconductivos porque actúan como andamio de soporte para el crecimiento del nuevo hueso. Por otra parte, reduce la probabilidad de provocar reacciones alérgicas e infecciones y es imposible la transmisión de enfermedades, ya que son histocompatibles y no inmunogénicos (139).

Las zonas donantes más habituales son el peroné, la zona distal del radio y la cresta ilíaca, siendo esta última la más frecuente. Los autoinjertos pueden ser de hueso cortical vascularizado o no vascularizado, y de hueso esponjoso, teniendo este último peores propiedades mecánicas pero mayor poder osteogénico (140).

El uso de injertos óseos autólogos no está exento de desventajas. Entre las mismas se encuentran la necesidad de una cirugía adicional, lo que conlleva un aumento del tiempo de intervención y de la dificultad técnica para la obtención del injerto; se presenta una morbilidad añadida de la zona donante, que puede presentar incluso reabsorciones locales; existe limitación en su disponibilidad; la pérdida de las propiedades durante el autotransplante produce una reducción en su capacidad de soporte mecánico (141).

El **injerto de hueso alogénico o aloinjerto** es aquel que se transfiere entre dos individuos de la misma especie. Se obtiene de un donante cadáver o vivo. No posee capacidad osteogénica ya que no contiene células vivas; su capacidad osteoinductiva es escasa, pues apenas posee factores de crecimiento; pero sí tiene capacidad osteoconductora porque contiene la porosidad propia del hueso. La regeneración ósea empleando aloinjertos tiene lugar por las células mesenquimales que posee la zona receptora, que a su vez depende de la vascularización de dicho lecho. Entre las ventajas del uso de aloinjertos están evitar la morbilidad de la zona donante, ya que no se extrae del propio paciente; su disponibilidad es inmediata e ilimitada, ya que es posible su almacenamiento durante largos períodos de tiempo; además, se puede disponer de diferentes tamaños y morfologías. Entre las desventajas se pueden mencionar la pérdida de las propiedades mecánicas y biológicas que sufre el injerto por ser sometido a procesos de esterilización; al no poseer células mesenquimales, la incorporación de estos injertos es más lenta; también presenta mayor incidencia de complicaciones que el hueso autólogo, como son la pseudoartrosis o las fracturas, generalmente estos problemas tienen lugar durante el primer año, haciéndose inapreciables a partir del tercer año postoperatorio. Quizá las desventajas más importantes relacionadas con este tipo de injertos sean los problemas de inmunogenicidad, que pueden provocar un rechazo del injerto, y la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas. Por último, el coste de la obtención del aloinjerto, así como de su esterilización y conservación, es elevado (142,143).

Los injertos de hueso autólogos se obtienen de un “Banco de Tejidos y Huesos”. Se trata de una “institución o unidad técnica sin

ánimo de lucro, encargada de la obtención, procesamiento, preservación y almacenamiento de tejidos humanos con vistas a su distribución para su aplicación clínica como aloinjertos”. La descripción del uso de tejido humano procedente de un banco de tejidos fue descrita por Inclan en 1942. El primer banco de tejidos del mundo data de la década de los 50, el US Navy Tissue Bank. En Europa, el primer banco de tejidos se fundó en Checoslovaquia en el año 1952 (144).

Los criterios de exclusión de los tejidos osteoarticulares para evitar la transmisión de enfermedades son mayores que para otros tejidos porque la vida del paciente que los necesita no corre peligro. Los criterios de edad para la donación de tejidos varían entre los diferentes bancos de tejidos. Para el hueso esponjoso se sitúa entre los 80-85 años, para la donación de tendones y ligamentos el límite suele estar en los 55 años, aunque existen bancos que permiten hasta los 65. La edad de donación de menisco se sitúa entre los 16-45 años; y para la donación de hueso estructural (por ejemplo, un fémur entero), el donante debe ser menor de 45 años (70).

El momento idóneo para la extracción del tejido óseo es entre las 6 y 12 horas tras el fallecimiento del donante. Una vez realizada la extracción del injerto, el cuerpo donante debe ser reconstruido según la normativa vigente. En la actualidad, es Real Decreto Ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos (145).

Para la esterilización de los injertos obtenidos se emplean medios físicos (irradiación o calor por autoclave o ebullición) o químicos (óxido de etileno, alcohol, amonios o agentes quelantes). La congelación tiene escasa repercusión, pero la irradiación con una dosis superior a 3 megarads reduce sus propiedades en un 50-75%, y la liofilización (método usado con frecuencia) puede reducirlas hasta en un 55-90%. La esterilización por autoclave, método poco empleado en la actualidad, reduce la resistencia y rigidez por la despolimerización

del colágeno (146). Por tanto, para la conservación de estos injertos, generalmente se emplean métodos como la crioconservación, liofilización, refrigeración o congelación (147).

Los **xenoinjertos** se obtienen de animales de diferentes especies que el huésped. Generalmente, son de origen bovino, equino o procedente de corales o algas. Estos injertos se emplean con frecuencia en el ámbito de la cirugía oral y maxilofacial, y serán descritos con mayor detalle posteriormente (148).

El proceso biológico de incorporación del injerto reduce la resistencia mecánica debido a la actividad de los osteoclastos que producen zonas de reabsorción aleatorias, que no se corresponden con las zonas de esfuerzos predominantes. En los injertos corticales se produce un aumento de porosidad con el proceso de sustitución del material por hueso; esto produce una disminución de la resistencia mecánica. El injerto de hueso esponjoso presenta menores propiedades mecánicas iniciales que el hueso cortical, pero en su caso esta situación se ve subsanada por la rápida incorporación de hueso nuevo que se produce en este tipo de injertos gracias a su porosidad e interconexión sin que previamente tengan lugar áreas de reabsorción significativa (149).

1.3.3.1.2- Sustitutos Óseos

Los sustitutos óseos consisten en sustancias y materiales sintéticos que pretenden sustituir al autoinjerto óseo con fines terapéuticos. Para ello deben ser osteomiméticos, es decir, poseer una porosidad tridimensional con interconexiones que permita su infiltración por los vasos sanguíneos y células con la mínima reacción fibrosa; así como tener una resistencia a la tensión y compresión similar al tejido óseo. Otros requisitos de los sustitutos óseos son, al igual que para los materiales mencionados hasta el momento, la biocompatibilidad, la bioactividad, la biodegradabilidad y la bioconductividad para que se produzca osteointegración. También es necesario que sean materiales

no inmunogénicos, esterilizables, industrializables, de fácil transporte y almacenaje y de bajo coste. En un principio se consideraba que estos materiales no tienen poder osteogénico ni osteoinductor, pero se ha demostrado que algunas cerámicas tienen poder osteoinductor tras producir la formación ósea cuando son implantados en tejidos extraesqueléticos (150). Las propiedades físicas más valoradas para los implantes óseos en ortopedia son la resistencia a la compresión (debe superar los 50 MPa), la estabilidad mecánica, la rigidez, la fuerza, la ductilidad, la resistencia a la corrosión... Por último, deben ser materiales fáciles de esterilizar y almacenar, y deben suponer una buena relación coste-beneficio (84).

Con el empleo de un sustituto óseo lo que se pretende es que tenga lugar el remplazo del mismo por hueso. Que se produzca este proceso, depende de los siguientes parámetros: la composición química, la estructura física (porosidad, tamaño de partícula, superficie específica, cristalinidad) y la cinética de degradación del material. La microestructura condiciona la viabilidad, la proliferación y expresión génica de las células (151). La porosidad y la microtopografía de la superficie de un material intervienen en la permeabilidad a los fluidos, el reclutamiento de citoquinas y la mecanotransducción celular. En lo que concierne a la cinética de degradación del material, es necesario que este aguante física y químicamente mientras tiene lugar el proceso de sustitución por el hueso. Lo deseable es que se degrade un 2-3% semanalmente (152,153).

Con respecto a la composición química, se ha demostrado que la liberación y disolución de algunos iones modifica el pH local lo que influye en la liberación de otros iones, en la adsorción proteica, la ligazón de citoquinas, la respuesta de las células... (41,42)

Los sustitutos óseos se presentan en forma de bloques sólidos densos, porosos, gránulos o como pastas y cementos. Las formas porosas son preferibles para la formación de hueso. Para conseguir la porosidad existen diferentes métodos (introduciendo aire o sustancias como el poliuretano, a través de la deposición del material sobre un esqueleto que desaparece con el sinterizado...). La pieza obtenida

puede ser macroporosa o microporosa, con un patrón de porosidad de diferentes morfologías (esférico, exahédrico o dodecahédrico), ordenado o desordenado. Cuando se emplean pastas y cementos es necesario tener en cuenta parámetros como la viscosidad, inyectabilidad, cohesión, forma de mezclado, tiempo de fraguado, resistencia (habitualmente se sitúa entre los 10 y 100 MPa), rigidez a la torsión... Existen con diferentes formas de presentación; premezclados, que se activan con el cambio de las condiciones ambientales; o con las fases separadas, por lo que necesita mezclado.

El cemento de fosfato cálcico es un sustituto óseo inyectable y fue introducido en la década de los 80 por Brown y Chow. Presenta dos fases, una sólida compuesta por un polvo, y una líquida. Al ser mezcladas se forma una pasta moldeable e inyectable que endurece de forma gradual, lo que le otorga mayor fuerza mecánica. Este material facilita la técnica del relleno óseo in situ con una perfecta adaptación. Las propiedades como el tiempo de fraguado, la fuerza de compresión, la solubilidad y la velocidad de reabsorción in vivo se ven afectadas a través de modificaciones en los procesos de fabricación del cemento; como por ejemplo modificando la microestructura o incorporando factores de crecimiento (154,155).

Las cerámicas que se emplean como sustitutos óseos se presentan como sólidos cristalinos (cerámicas), sólidos amorfos (vidrios bioactivos o biovidrios con alto contenido en SiO_2) o sólidos amorfos con núcleos de cristalización (vitrocerámicas). Estos productos presentan ventajas a la hora de emplearlos como sustitutos óseos porque son bien tolerados, ya que no producen reacción inflamatoria y se evita el riesgo de transmisión de enfermedades; además, su disponibilidad es ilimitada y presentan una tasa de neoformación ósea elevada. Las desventajas más importantes, como se ha mencionado, son sus pobres propiedades mecánicas (fundamentalmente la fragilidad), por tanto, se emplean generalmente como implantes que no deben soportar cargas (recubrimiento de implantes dentales, recubrimiento de implantes metálicos articulares, relleno de defectos óseos en cirugía bucal y ortopédica...).

Los **vidrios bioactivos o biovidrios con alto contenido en SiO₂** son sólidos amorfos con elevado desorden estructural. Hench y cols., en 1969, descubrieron el vidrio bioactivo de primera generación, 45S5 Bioglass®, cuya composición es 45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24.5% CaO y 6% P₂O₅ (156). Entre los objetivos de la síntesis de este material, figuraban la necesidad de prevenir la liberación de sustancias citotóxicas y contener iones Ca²⁺ y PO₄³⁻. Por este motivo, se empleó el silicio para estabilizar la red vítrea, obteniendo un vidrio de fosfato cálcico sobre una matriz de sílice. Observaron entonces que el hueso se une a algunos vidrios sin interposición de tejido fibroso, debido a una capa de hidroxycarbonatoapatita (HCA) que se forma en la superficie de los mismos al estar en contacto con los fluidos biológicos. Esto sucede porque al contactar el vidrio bioactivo con un medio acuoso fisiológico, se forma una capa de gel de sílice en la superficie del mismo, y los iones de calcio y fosfato que contiene precipitan en cristales de hidroxapatita. De este modo, se forma una fuerte unión entre el hueso y el material, pues los iones de calcio, fosfato y sílice que se liberan estimulan la proliferación de los osteoblastos circundantes. Éstos producen fibras de colágeno que son incorporadas a la capa de HCA formando la estrecha unión hueso-biovidrio, que posee un grosor de 100 a 200 µm (120). Diferentes vidrios bioactivos se comercializaron, a partir de 1982 en Europa, EE. UU. y algunos países orientales en distintas formas de presentación destinados sobre todo a su uso como injertos en el campo de la cirugía ortopédica, maxilofacial y oral. El Bioglass® representa el material aloplástico más rápido en crear un enlace directo con el hueso, con un tiempo estimado de horas (157).

Para mejorar las propiedades mecánicas y térmicas de los vidrios bioactivos, se desarrollaron las **vitrocerámicas**. Se trata de cerámicas policristalinas obtenidas por cristalización controlada de vidrios, donde coexisten la fase amorfa y la fase cristalina. Esto se consigue sometiendo a los vidrios a un tratamiento térmico, cristalizando así el 90% de su masa vítrea y obteniendo cristales que se sitúen entre 0.1 y 1 micras. El primer material comercial, denominado Biosilicate®, poseía una bioactividad igual a la de Bioglass®, favoreciendo que tuviese lugar una estrecha unión de este material con el hueso

circundante. Su composición química incluye sílice (Si), oxígeno (O), sodio (Na), calcio (Ca) y fósforo (P); siendo liberados en solución Si(OH)_4 , Na^+ , Ca^{2+} y PO_4^{2-} , y formándose HCA en su superficie, lo que favorece la unión con el tejido óseo (158).

La primera referencia del empleo de una **cerámica** como sustituto óseo data de 1892, estudio en el que Dressman realizó en ocho pacientes el relleno de defectos óseos de huesos largos a causa de infección con sulfato cálcico y fenol al 5 % o yeso Paris (159). El sulfato cálcico actúa como un andamio osteoconductor para la angiogénesis y el crecimiento celular. Se reabsorbe completamente en 7-8 semanas in vivo por disolución, sin provocar reacciones inflamatorias ni antigénicas. Se emplea generalmente combinado con materiales como autoinjertos, aloinjertos, fosfatos de calcio o vidrios bioactivos. Cuando el sulfato de calcio es implantado en el cuerpo, se liberan iones calcio y fosfato que se combinan entre sí a partir de los fluidos del cuerpo para formar fosfato de calcio. Esto forma una red osteoconductiva de apatita biológica que estimula el crecimiento óseo en el defecto. Con espectroscopía infrarroja se mostró que el nuevo material depositado es principalmente hidroxiapatita carbonatada (160). Además del empleo del sulfato de calcio como material de injerto óseo en regeneración de defectos, cirugías de elevación de seno, preservación de reborde alveolar postextracción; se ha utilizado como membrana o barrera, y también como vehículo de factores de crecimiento, moléculas pequeñas, antibióticos o medicamentos. A pesar de su fácil y barata obtención, debido a sus escasas propiedades mecánicas en condiciones de humedad, su uso como relleno de defectos óseos se ve limitado (161).

Las cerámicas de fosfato cálcico son materiales muy cristalinos debido a su tratamiento a alta temperatura, más de 1000 °C. A pesar de la similitud en la composición química con las apatitas biológicas (hueso, dentina y esmalte), presentan diferencias debido a que son compuestos no estequiométricos, de muy baja cristalinidad debido a su pequeño tamaño de partícula y presentan una elevada superficie específica. Entre las propiedades más interesantes de las apatitas están su capacidad para liberar iones como Ca^{+2} y PO_4^{+3} y su solubilidad en

un medio acuoso. Esto estimula la colonización en su interior por células y proteínas y la formación de hueso nuevo.

Como ha determinado Ducheyne en 1999, los cambios que se producen en la interfase entre una cerámica bioactiva y el tejido vivo serían, de forma ordenada, los siguientes (Fig. 1.9): (1) disolución de la cerámica, (2) precipitado de la solución en la cerámica, (3) intercambio iónico y reorganización estructural en la interfase cerámica-tejido, (4) interdifusión desde la capa superficial hasta la cerámica, (5) efectos mediados por la disolución sobre la actividad celular, (6) deposición de la fase mineral o de la fase orgánica sin integración en la superficie de la cerámica, (7) deposición con integración de la cerámica, (8) quimiotaxis hacia la superficie de la cerámica, (9) adhesión celular y proliferación, (10) diferenciación celular y (11) formación de la matriz extracelular. (162).

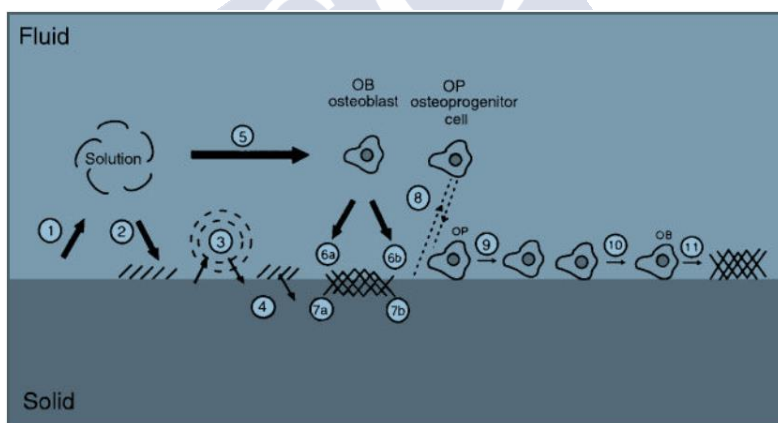


Fig. 1.9: Imagen en la que se esquematizan los eventos anteriormente citados que tienen lugar entre las cerámicas bioactivas y el ambiente fisiológico. Adaptada de (162), con permiso de Elsevier, licencia nº 4363700490855.

Para determinar la capacidad osteogénica que poseen las diferentes cerámicas, son útiles los marcadores mRNA correspondientes a proteínas que se secretan durante la diferenciación de los osteoblastos como el colágeno tipo I y la fosfatasa alcalina; y proteínas no

colagénicas de la matriz ósea como la osteonectina, la osteopontina y la osteocalcina, que se expresa durante la mineralización ósea (163).

La fórmula genérica de las apatitas es: $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6(\text{Y})_2$. Me son cationes bivalentes, XO_4 son aniones trivalentes e Y son aniones monovalentes. Las reacciones a altas temperaturas permiten que los aniones Y, y en algunos casos, los cationes, sean sustituidos por otros iones (164). Dentro de los fosfatos cálcicos se presentan los metafosfatos, que contienen grupos PO_3^{3-} , los pirofosfatos, con grupos $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$ y los ortofosfatos, que contienen grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$. Para las aplicaciones biomédicas son de interés los ortofosfatos, ya que en los sistemas biológicos, el ortofosfato cálcico es el principal componente inorgánico de los tejidos calcificados, ya sean normales o patológicos (cálculos o lesiones ateroscleróticas). Por otra parte, los pirofosfatos y metafosfatos se hidrolizan en contacto con los fluidos biológicos, convirtiéndose en ortofosfatos. Entre los materiales fosfocálcicos desarrollados existe una variabilidad en la relación Ca/P que oscila entre 0.5 y 2.0 (165).

En el ámbito de la biomedicina las cerámicas fosfocálcicas se clasifican en dos grupos según el método por el que son sintetizadas. Por un lado, están los fosfatos cálcicos de baja temperatura, que son obtenidos por precipitación a partir de una solución acuosa a temperatura ambiente. Por otro lado están los fosfatos cálcicos de alta temperatura, que se obtienen a través de una reacción térmica (166).

Los fosfatos cálcicos de baja temperatura son:

- El fosfato monocálcico monohidratado (MCPM).
- El fosfato monocálcico anhidro (MCPA).
- El fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, “brushita”).
- El fosfato dicálcico anhidro (DCPA, “monetita”).
- El fosfato octacálcico (OCP).
- La hidroxiapatita precipitada (PHA).
- El fosfato cálcico amorfo (ACP).

Tabla 1.1: Clasificación de los distintos compuestos de fosfato de calcio empleados en biomedicina con su fórmula química, la relación Ca/P y la densidad teórica.

	COMPUESTO	FÓRMULA	RELACIÓN Ca/P	DENSIDAD (g/cm ³)
BAJA TEMPERATURA	Fosfato monocalcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	2.23
	Fosfato monocalcico anhidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	2.58
	Fosfato dicalcico dihidratado (DCPD, “brushita”)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	2.32
	Fosfato dicalcico anhidro (DCPA, “monetita”)	CaHPO_4	1.0	2.89
	Fosfato octacalcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	2.61
	Hidroxiapatita precipitada (PHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1.67	3.16
	Fosfato calcico amorfo (ACP)	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.2-2.2	2.9
ALTA TEMPERATURA	α -fosfato tricalcico (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)$	1.5	2.86
	β -fosfato tricalcico (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)$	1.5	3.07
	Fosfato calcico bifasico (BCP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 / \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)$	1.5-1.67	3.07-3.16
	Hidroxiapatita calcio-deficiente (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	1.5-1.67	3.16
	Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	3.16
	Oxiapatita (OXA, OAp, OA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1.67	3.16
	Fosfato tetraalcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	3.05

Los fosfatos cálcicos de alta temperatura son los que adquieren relevancia en el ámbito médico. Los más importantes son los siguientes:

- El α -fosfato tricálcico (α -TCP).
- El β -fosfato tricálcico (β -TCP).
- El fosfato cálcico bifásico (BCP), compuesto por HA y β -TCP.
- La hidroxiapatita calcio-deficiente (CDHA)
- La hidroxiapatita (HA).
- La oxiapatita (OXA).
- El fosfato tetracálcico (TTCP).

1.3.3.2- Biomateriales en Regeneración Ósea Guiada

Los biomateriales que se emplean en regeneración tisular guiada en el ámbito de la cirugía oral y maxilofacial son el relleno óseo, la membrana barrera y, en caso de que se haga colocación simultánea a regeneración ósea guiada, el implante. Estos materiales, para ser empleados, deben estar documentados en estudios preclínicos y clínicos.

1.3.3.2.1- Membranas Barrera

Se emplea como una barrera mecánica para dirigir la regeneración tisular favoreciendo la cicatrización del tejido óseo, impidiendo la entrada del tejido conectivo blando en el defecto óseo. Las características básicas que deben poseer estas membranas se mencionan a continuación. En primer lugar, la biocompatibilidad, para emplear una membrana barrera deben ser comprobados parámetros como la citotoxicidad, histocompatibilidad, genotoxicidad, mutagenicidad y efectos microbianos, sobre todo en aquellas membranas biorreabsorbibles que generan productos de desecho. Debe provocar una oclusión celular, es decir, la membrana debe excluir células de

tejido conectivo de la región en la que debe producirse la regeneración ósea, pero es recomendable que sea porosa para permitir la transferencia de nutrientes. Debe integrarse con el tejido, esto depende de la topografía superficial, de la porosidad, de las propiedades químicas... Debe mantener un espacio, resistirse al colapso para mantener un volumen y geometría suficiente, esta propiedad viene determinada por la rigidez del material, las membranas biorreabsorbibles tienen propiedades mecánicas más desfavorables que las no reabsorbibles, por ello se emplean en combinación con injertos o sustitutos óseos. Para incrementar la rigidez del material, algunas membranas de politetrafluoretileno se refuerzan con titanio. El manejo durante la intervención debe ser fácil para poder adaptar la membrana al tamaño y morfología del defecto óseo, las membranas reabsorbibles son más dúctiles e hidrofílicas y se adhieren al material de relleno y al hueso cuando se humedecen, las membranas no reabsorbibles, en cambio, necesitan ser fijadas con tornillos y chinchetas por su rigidez y características hidrofóbicas. Las membranas no reabsorbibles sufren mayor riesgo de exposición, lo que puede ocasionar la infección de la herida (167–169).

Como se ha mencionado, existen dos tipos de membranas: las membranas no reabsorbibles y las membranas biorreabsorbibles. Las membranas no reabsorbibles se crearon en 1969 con el desarrollo del poliuretano expandido (PTFEe) y fueron comercializadas en 1971 por GoreTex®. El PTFEe es un fluoropolímero sintético que se basa en un enlace potente entre el carbono y el flúor. Este material puede comprimirse o estirarse, también posee cierta rigidez reforzándolo con etilenopropileno fluorado. Estas membranas fueron estándar en las décadas de los 80 y 90. Otra desventaja del uso de estas membranas, además de que dehiscencias en la misma suponen un riesgo de infección como ya se ha mencionado, es el hecho de que sea necesario realizar una segunda intervención para eliminarla, lo que ocasiona molestias y un coste adicional para el paciente (170–172). Las membranas biorreabsorbibles tienen la ventaja de que la segunda cirugía es eliminada, simplificando el procedimiento quirúrgico, ofreciendo así una menor morbilidad y una mayor rentabilidad para el paciente.

Existen dos tipos de membranas reabsorbibles: las membranas poliméricas y las membranas colágenas. Las membranas poliméricas están confeccionadas con poliésteres sintéticos poliglicoles (PGA), polilácticos (PLA) o sus copolímeros. Su disponibilidad es prácticamente ilimitada y se pueden confeccionar en condiciones reproducibles y controladas. Se biodegradan en dióxido de carbono y agua a través del ciclo de Krebs. Las membranas colágenas, son las más empleadas. Estas membranas están confeccionadas a partir de colágeno tipo I o de una combinación de colágeno tipo I y III. Las fuentes de colágeno incluyen el tendón bovino, la piel de ternera y dermis bovina o porcina. La membrana más utilizada y mejor documentada es la membrana colágena no reticulada de origen porcino (Bio-Gide, Geislich), que será utilizada en la presente tesis doctoral. Además de evitar una segunda cirugía de extracción, estas membranas presentan las ventajas de que en el caso de ser expuestas no son susceptibles de infección y, por otra parte, su manejo es sencillo gracias a sus propiedades hidrofílicas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que su propiedad de barrera viene limitada por su velocidad de degradación (se reabsorbe entre 4 y 8 semanas), y este proceso da lugar a la disminución de sus propiedades mecánicas (173,174).

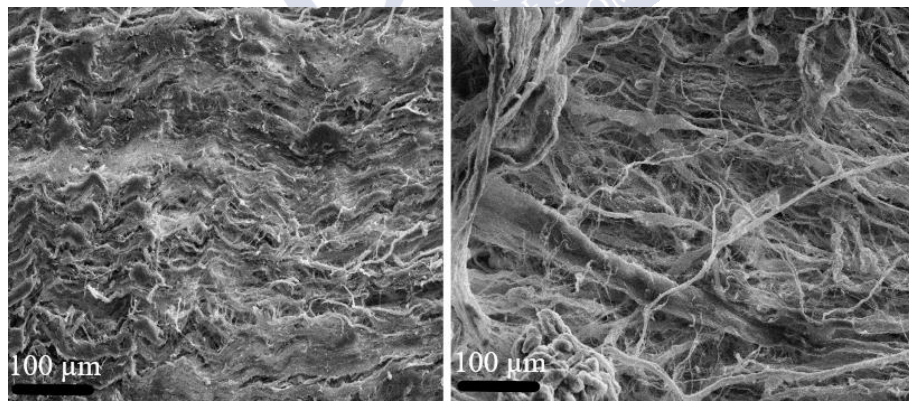


Fig. 1.10: Imágenes de microscopía electrónica que muestran una membrana colágena (Bio-Gide, Geislich®) por ambos lados. Se pueden observar las fibras de colágeno que la conforman siguiendo una misma dirección, paralelas entre sí.

La cicatrización de los tejidos, sobre todo del tejido blando, se produce de forma diferente en función de si están en contacto con una membrana reabsorbible o una membrana no reabsorbible. Cuando se emplea una membrana no reabsorbible, el tejido de la periferia consiste en tejido conectivo blando cubierto por epitelio queratinizado, y una matriz colágena en la que las fibras incrementan de diámetro a medida que se aproxima a la membrana. En la zona de la membrana situada hacia el defecto, predomina tejido conectivo laxo con fibras colágenas finas, bien vascularizado. La porosidad de la membrana (con poros de 50 μm) permite la entrada de vasos sanguíneos, capilares y fibroblastos (100). El proceso de degradación de la membrana colágena se produce a partir de un infiltrado celular que aumenta hasta transcurridas 2 semanas. A las 6 semanas se observan signos de degradación en la membrana y, tras 12 semanas, ya no hay infiltrado celular y la membrana ha desaparecido (175).

Hoy día existe controversia sobre si el empleo de membranas colágenas junto con injertos óseos ofrece efectos sinérgicos en la formación de hueso nuevo debido a las propiedades osteogénicas que se le otorgan, o si su contribución en la regeneración de hueso es más bien limitada.

1.3.3.2.2- Materiales de relleno óseo

Se emplean para mejorar los resultados terapéuticos y la previsibilidad en la regeneración ósea. Por tanto, sus funciones durante el empleo de esta técnica son soportar la membrana para evitar un colapso de la misma, acelerar el proceso de neoformación ósea y ayudar a mantener el volumen óseo creado. Debido a que no es fácil que un material posea propiedades osteogénicas y a su vez la capacidad de mantener su volumen a lo largo del tiempo, en 1998 se comenzaron a utilizar de forma combinada distintos materiales de sustitución ósea, como por ejemplo, hueso autólogo y un aloinjerto de baja sustitución, como es el hueso bovino desproteinizado (176).

Un factor que determina el tipo de injerto a emplear es el tamaño del defecto óseo. Este puede ser pequeño, como en el caso de defectos periimplantarios o fenestraciones de implantes; o grandes defectos del esqueleto facial, como cuando hay necesidad de aumentar la altura y anchura crestal para la colocación de implantes endoóseos.

Otros factores son dependientes de la aplicación clínica. En un alveolo postextracción es preferible el empleo de un material que se reabsorba completamente; en zonas en las que se busca restablecer el contorno alveolar se buscará un material de baja tasa de reabsorción o incluso no reabsorbibles (177).

1.3.3.2.2.1- Autoinjertos en ROG

Pueden ser extraídos de zonas intraorales o extraorales. Su composición consiste en un 30% de productos orgánicos, de los cuales la mayor parte es colágeno tipo I y proteínas no colágenas. El 70% restante son compuestos inorgánicos (fosfato cálcico en forma de hidroxiapatita). Una vez trasplantado, los diferentes factores de crecimiento y células osteogénicas viables que están presentes en el injerto, invaden la zona receptora. La cantidad y concentración de células y factores de crecimiento dependen de factores como la edad del paciente o presencia de enfermedades sistémicas en el mismo, la localización de la zona donante, y de variabilidades individuales. Los bloques de injerto de hueso esponjoso contienen células en mayor cantidad y de mayor calidad que el hueso compacto, y además liberan con mayor rapidez factores de crecimiento por poseer mayor área de superficie. Una desventaja del empleo del autoinjerto es su tasa de reabsorción, que puede alcanzar hasta el 60% (178,179).

Los tipos de injertos autógenos más empleados en ROG son los injertos en bloque, los injertos de aposición y los injertos en partículas.

Los injertos en bloque pueden ser monocorticales, corticoesponjosos o bicorticales. Suelen ser inmovilizados por tornillos

y su sustitución por hueso neoformado se produce por invasión. Las zonas donantes más habituales son la sínfisis del mentón y la rama mandibular. La sínfisis es una zona de fácil acceso y se dispone de grandes cantidades de hueso cortical y esponjoso, además su tasa de reabsorción es mínima. La rama mandibular se emplea en zonas de menor tamaño y generalmente para aumentar la anchura. Se obtiene del cuerpo mandibular, de la zona entre el 1º y 2º molar. Este injerto se compone fundamentalmente de hueso cortical. El empleo de estos injertos no está exento de complicaciones: dehiscencia de la herida, dolor postoperatorio, hematoma postquirúrgico, riesgo de infección, ptosis del mentón, parestesia temporal del nervio mentoniano, sensibilidad pulpar alterada reversible en los dientes próximos a zona donante... (180,181)

Los injertos de aposición se componen principalmente de hueso cortical, son más finos que los injertos en bloque. La zona donante más habitual es el área retromolar de la mandíbula y, en ocasiones, el arbotante cigomáticomaxilar. Este tipo de injertos está indicado para el aumento del reborde en zonas estéticas.

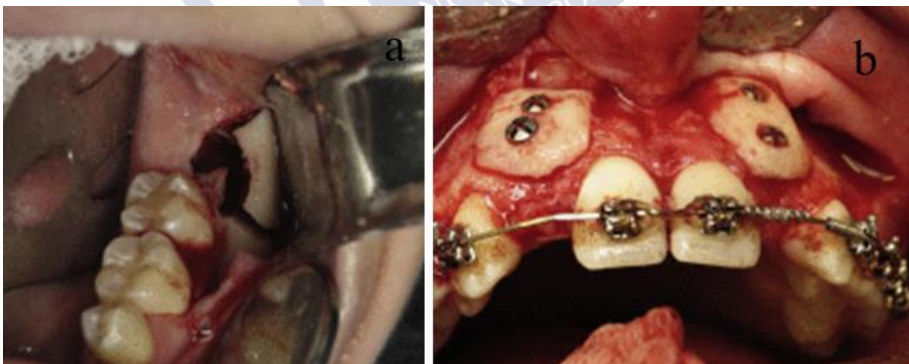


Fig. 1.11: Imágenes de (a) injerto en bloque que fue retirado de la zona retromolar y (b) colocado en la zona correspondiente con los dientes 12 y 22 para aumentar el volumen óseo en anchura para colocación de implantes. Adaptada de (182), con permiso de Elsevier, licencia n° 4363690205721.

Los injertos en partículas poseen mayor osteoinducción y osteoconducción que los injertos en bloque, dado que poseen mayor

área de superficie y factores de crecimiento. Su tratamiento previo en un molinillo de hueso o su obtención con gubias hace que su cantidad en células osteogénicas sea menor. Su origen puede ser cortical o esponjoso, el primero se obtiene mediante raspadores de hueso, escoplos, gubias o curetas; y el segundo moliendo injertos en bloque. El tamaño de las partículas oscila entre 250 μm y 2 mm. Por otro lado, su tasa de reabsorción y su estabilidad mecánica son menores, por lo que se emplean en las oquedades que permanecen entre bloque y lecho, en alveolos postextracción, en defectos óseos periimplante o en elevaciones de seno. En ocasiones se combina con sustitutos óseos (183,184).

1.3.3.2.2.2- Aloinjertos en ROG

A pesar de que el empleo de los aloinjertos se remonta a hace más de 120 años y de que no se deriva morbilidad en la zona donante cuando son empleados, su uso en ROG no ha sido muy extendido por el riesgo de transmisión de enfermedades como la hepatitis y el VIH. Pueden emplearse como hueso congelado fresco, aloinjerto de hueso liofilizado (AHL), aloinjerto de hueso desmineralizado (AHDL). Son más empleados en EE. UU. que en Europa. Su tasa de reabsorción es incluso mayor que la del autoinjerto (185,186).

Los minerales óseos derivados de animales, en particular el hueso mineral desproteinizado obtenido de vaca (deproteinized bovine bone minerals, DBBMs), es el más empleado y estudiado a causa de su similitud con el hueso humano. Su nombre comercial es Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Switzerland); y se trata de una apatita carbonatada con propiedades químicas, morfológicas y ultraestructurales son muy similares a las del hueso humano (100). El Bio-Oss® es uno de los materiales empleados en este trabajo de investigación. Estos minerales deben ser tratados con químicos y calor para eliminar los componentes orgánicos que puedan provocar reacciones inmunológicas en el receptor o transmisión de enfermedades, es decir, ser sometidos a un proceso de desproteinización

y esterilización. Estos procesos no deben alterar los microcristales de apatita, con un tamaño aproximado de 100 μm de diámetro, pues cuando dichos cristales son sometidos a temperaturas por encima de 1000 °C aumentan de tamaño y se produce su sinterización desapareciendo parte de los espacios intercristalinos, reduciéndose su microrrugosidad y porosidad. Su superficie específica está en torno a 79.7 m^2/g y contiene poros de entre 2 y 50 nm que presentan interconexiones de más de 1 μm (187). Para su uso en clínica se presenta en diferentes morfologías según el tipo de defecto a rellenar. Pueden ser partículas de diferentes tamaños, hueso cortical o esponjoso, o bloques. Este material es útil en el ámbito de la cirugía oral para el relleno de diferentes cavidades con excelente tolerancia, integración y mantenimiento del espacio a largo plazo. Su capacidad es fundamentalmente osteoconductora, y su reabsorción muy lenta debido a su insolubilidad en fluidos orgánicos, en muestras histológicas de este material se han observado osteoclastos en la superficie del mismo transcurridos 4 años desde la implantación. Algunos autores incluso consideran su tasa de reabsorción nula, ya que pueden encontrarse partículas de sustituto de hueso bovino 10 años después de la intervención (188,189). Con la aparición del Síndrome de Creutzfeldt-Jakob en humanos en el Reino Unido en el año 1996, se han producido dudas con respecto a la seguridad del Bio-Oss®. La comprobación de la ausencia de proteínas mediante tests de alta sensibilidad, imposibilita la transmisión de cualquier enfermedad; por otra parte, no existen documentados casos de transmisión de enfermedades (190).

Otra alternativa como sustituto óseo proveniente de distintas especies es la hidroxiapatita obtenida del esqueleto de algunos géneros de coral marino de las especies porites y goniopora. Consiste en una fase mineral compuesta principalmente de carbonato cálcico con algunas impurezas, aunque casi idéntica al componente mineral del hueso, y una matriz orgánica. Presenta una estructura porosa similar a la del hueso esponjoso, con un diámetro de poro entre 200 y 600 μm . La fuerza a la compresión es superior a la del hueso esponjoso, aunque también lo es su fragilidad. Apenas sufre reabsorción osteoclástica por lo que permanece visible radiográficamente por mucho tiempo (191).

El carbonato de calcio coralino se transforma en HA coralina por reacción de intercambio hidrotérmico con el fósforo. Esta obtención de hidroxiapatita por medio de un proceso de intercambio hidrotermal fue descrita por Roy y Linnehan en 1974. Se trata el coral para eliminar la proporción orgánica y se expone a presión y calor extremos en solución acuosa de fosfato para lograr una HA esterilizada (192). Su potencial osteoconductor es inferior al de otros materiales como el autoinjerto o incluso materiales sintéticos como el β -TCP; y su tasa de reabsorción es más lenta. Además, presenta una elevada tasa de complicaciones tardías como la formación de dehiscencias o la encapsulación de los gránulos.

1.3.3.2.2.3- Sustitutos Óseos en ROG

Los sustitutos óseos en el ámbito de la cirugía maxilofacial y oral, al igual que en otras especialidades médicas, han sufrido una gran aceptación en los últimos 40 años por las ventajas ya mencionadas. Además de que su utilización no conlleva riesgo de transmisión de enfermedades, se evita una cirugía adicional de la zona donante; pero es necesario destacar la posibilidad de un diseño individualizado en función de cada indicación clínica. Puede controlarse la composición química, optimizarse el tamaño e interconectividad de los poros para que se produzca la entrada de los vasos sanguíneos de forma idónea, puede variarse la distribución de las fases cristalina y amorfa, puede ajustarse la morfología de los bloques o gránulos, etc.

Diversos estudios que utilizan una variedad de materiales han demostrado el papel fundamental de las proteínas de adhesión extracelular (fibronectina y vitronectina en particular) en la adhesión, la morfología y la migración celular. El patrón en el que se adsorben las proteínas de adhesión y otras moléculas bioactivas provoca reacciones celulares específicas, este hecho depende fundamentalmente de las propiedades fisicoquímicas subyacentes del material. Estos eventos son la base de las respuestas posteriores requeridas para la reparación del tejido. Los estudios in vitro generalmente demuestran respuestas

celulares favorables a superficies hidrófilas, por tanto, uno de los problemas clave que aún no se ha resuelto es el de la composición de la interfaz donde se encuentran los osteoblastos dentro de la secuencia de inflamación y regeneración ósea (193). Hasta el momento no ha sido posible preparar un material macroporoso con la rugosidad de superficie que simule al hueso mineral natural.

Los materiales actualmente comercializados en ROG se dividen en tres grupos (194):

- **Fosfatos de calcio:** Son los más empleados. Entre ellos destacan el β -TCP y la HA por su semejanza a la fase inorgánica del hueso. En los últimos años ha aumentado el uso de compuestos bifásicos HA/TCP con relación variable, para aprovechar las propiedades estables de mantenimiento de la HA y de reabsorción del TCP (195). La respuesta del hueso frente a estos materiales difiere en función de las variaciones en su forma de presentación aunque la composición química sea la misma; es decir, la regeneración ósea difiere en función de la microporosidad, la cristalinidad, el tamaño de cristales... (196)
- **Vidrios bioactivos:** Estos materiales han sido descritos con anterioridad. En ROG se emplean para conservación de la cresta alveolar y aumento del seno maxilar. Sus limitaciones radican en su naturaleza granular y ausencia de porosidad (197).
- **Polímeros:** Son composites que consisten en HA no sinterizada, nanocristalina, incorporada en una matriz de gel de sílice. Presentan una elevada porosidad interconectada. Con el empleo de este material se ha observado una elevada neoformación ósea (198).

1.3.4- LA HIDROXIAPATITA Y EL FOSFATO TRICÁLCICO COMO SUSTITUTOS ÓSEOS EN CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL

Las cerámicas de fosfato cálcico más empleadas y con mayor número de trabajos publicados en el campo de la regeneración ósea son la hidroxiapatita (HA), con fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ y una relación Ca/P de 1.67; y el fosfato tricálcico (TCP), con fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y una relación Ca/P de 1.5.

Ambos son materiales biocompatibles y osteoconductores, pero se sabe que las cerámicas sintéticas carecen de propiedades osteogénicas y osteoinductoras, además de que el soporte estructural que aportan es mínimo. La respuesta que generan en el tejido la HA y el TCP cuando son implantados en tejidos vivos, difiere de uno a otro (199).

1.3.4.1- La Hidroxiapatita (HA)

La HA cerámica es sometida a un tratamiento térmico de entre 700 y 1300 °C para formar una estructura altamente cristalina. La HA no presenta capacidad osteoinductora cuando es implantada ectópicamente (por ejemplo, en tejido muscular), aunque posee una elevada superficie específica (200). La degradación de la HA en el interior del cuerpo humano es muy lenta, por ello, algunos autores la han catalogado como un material bioinerte insoluble dentro del cuerpo humano. Su lenta degradación se produce a través de dos mecanismos: solubilidad (química) y fagocitosis (celular) mediada por osteoclastos y macrófagos. Existe controversia sobre si es preferible que el material presente una elevada cristalinidad que conlleve su lenta degradación, o que tenga mayor contenido amorfo y presente mayor solubilidad (201,202). La solubilidad de la HA, depende de factores como el pH del medio, pues es soluble a un pH inferior a 4.2 (203). La HA sintética tiene buena fuerza de compresión, pero es débil en tensión y cizallamiento. La principal desventaja de la HA es su fragilidad, las zonas que contienen estos implantes pueden convertirse en zonas de

estrés mecánico; por lo que suele combinarse con otros materiales, como por ejemplo el hueso autógeno, para mejorar sus propiedades y acelerar su velocidad de reabsorción (204,205).

Kim et al. realizaron un estudio en el año 2004 (206) para investigar las variaciones que se producían en la superficie, en la estructura y en el potencial de la HA cuando ésta era sumergida en un fluido corporal sintético. Resolvieron que la HA sufría tres cambios estructurales; en primer lugar, se producía sobre la superficie de la hidroxiapatita una formación de un fosfato cálcico amorfo rico en calcio a causa de la interacción de la superficie negativa de la HA con los iones calcio del fluido. El segundo cambio estructural se debe a la formación de una capa de fosfato cálcico amorfo pobre en calcio en la HA. Esto se debe a que la carga positiva de la capa de fosfato cálcico rico en calcio atrae a los iones negativos de fosfato del fluido formándose la capa de fosfato cálcico pobre en calcio. Por tanto, este hecho constituye una interacción electrostática. El tercer cambio estructural consiste en la formación de apatita. La capa de fosfato de calcio pobre en calcio se cristaliza en apatita con composición similar al hueso, que consiste en nanocristales de apatita que contiene iones carbonato y tiene una estructura defectuosa y poco cristalizada. Posteriormente esta capa aumenta su tamaño e incorpora iones calcio y fosfato del fluido. Esto disminuye su solubilidad otorgándole estabilidad. Las características de esta capa estimulan a los osteoblastos, que proliferan y se diferencian para formar la matriz extracelular. De este modo, la capa de apatita entra en contacto con el hueso circundante. Se puede decir que se forma una unión química entre el mineral del hueso y la apatita disminuyendo la energía interfásica entre ambos sustratos (207).

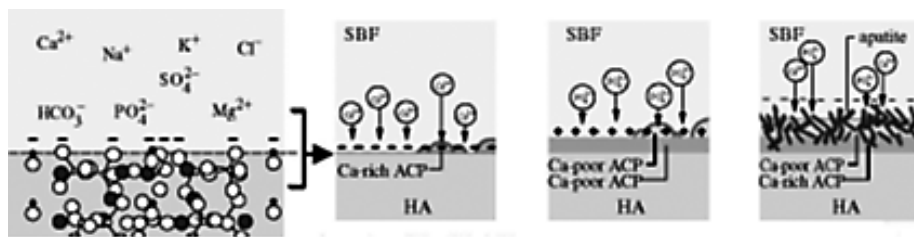


Fig. 1.12: Representación esquemática del origen de la carga negativa de la hidroxiapatita y el proceso de la formación de la capa de apatita similar a hueso. Imagen modificada con permiso de (206), licencia N° 4365930840577 de Elsevier.

Frame y cols. (1981), fueron los primeros en comprobar la biocompatibilidad y la capacidad para sustituir al hueso autógeno en el aumento de maxilares atróficos de la HA en perros Beagle (208). A raíz de este trabajo, diversos autores emplearon este material en humanos. Debido a su dificultad para moldearla en el quirófano, la HA se emplea en gránulos o bloques. Comercialmente, se comenzó a distribuir como granulado para relleno de lesiones periodontales. Posteriormente se empleó para uso de bloques de relleno y revestimiento de implantes dentales y ortopédicos como se ha citado en el apartado de biomateriales.

Cuando se introduce HA en un defecto óseo, se produce aposición directa del hueso sobre este material sin interposición de tejido fibroso (209). Habibovic et al. (2005), han implantado HA sinterizada a baja temperatura (1150°C) con una elevada microporosidad de superficie en músculos dorsales de cabras. A partir de sus resultados, han determinado que además de las propiedades osteoconductoras que se han mencionado, la HA posee capacidad osteoinductiva cuando se aumenta el área de superficie (210).

Las aplicaciones biomédicas fundamentales de la HA son tres: sustituto óseo, portador de medicamentos u otras sustancias y recubrimiento de implantes (211).

Como sustituto óseo en el ámbito de la cirugía maxilofacial, se ha empleado en intervenciones quirúrgicas como el aumento de rebordes

alveolares atróficos, en las técnicas de preservación alveolar, en defectos periodontales y periimplantarios, en elevaciones sinusales, en cirugía ortognática, para el relleno de defectos generados por quistes y tumores, etc.

El uso de la HA en la elevación del suelo sinusal ha sido ampliamente comprobado, tanto en estudios con animales, como en estudios en humanos. En animales, el empleo de HA porosa ha sido comparado con el uso de HA mezclada con hueso autólogo en ovejas y monos, realizando un estudio histomorfométrico e histológico a los 4 y 8 meses para comprobar la osteointegración de los implantes colocados. No hubo diferencias estadísticas entre ambos grupos, y los injertos mostraron gran cantidad de hueso nuevo formado, con un porcentaje de contacto entre hueso e implante satisfactorio, aunque inferior al existente entre el hueso residual y el implante (212). En humanos, se ha comprobado el éxito clínico y radiográfico de la HA empleada en la elevación de suelo sinusal a largo plazo. Lambert et al. (2010), reportaron que el empleo de HA bovina en la elevación de seno con colocación del implante inmediata es una técnica segura para la rehabilitación del maxilar en el sector posterior. Para ello colocaron un total de 102 implantes en 40 pacientes a los que les realizaron 50 elevaciones de seno. Transcurridos 6 años, obtuvieron un 98 % de éxito en la supervivencia de los implantes, y un 100% de éxito en la supervivencia de la rehabilitación protética (213).

Se ha estudiado la eficacia del empleo de HA en alveolos postextracción para favorecer el mantenimiento de hueso. Shakibaie MB (2013), empleó HA de origen bovino; y Canullo et al. (2016), colocaron HA enriquecida con Mg en 20 pacientes inmediatamente después de la realización de la exodoncia. Tomaron muestras transcurridos 4 y 12 meses, y concluyeron que el material era rodeado por el nuevo hueso con ausencia de infiltrado inflamatorio. A los 4 meses, se producía una cicatrización desde la zona más apical hacia la coronal, y transcurridos 12 meses, el alveolo había sido completamente regenerado (214). En contraste, Laurito et al. (2017), determinaron que no se pueden obtener conclusiones claras de los beneficios del uso de

HA nanocrystalina para la preservación alveolar, pues observaron una acusada reabsorción en los alveolos postextracción tras 6 meses de la colocación de la misma (215).

Se ha comprobado también la eficacia de la HA en la regeneración de defectos óseos periodontales. Figliuzzi et al. (2014) evaluaron histológicamente defectos periodontales de 100 pacientes, de 2 y 3 paredes, y mayores a 8 mm de profundidad, que habían sido rellenados con una hidroxiapatita comercial (Engipore®) un año antes. En las muestras tomadas observaron que se producía una gran cantidad de hueso, con la formación de hueso lamelar maduro en la proximidad a las partículas del sustituto óseo, estando éste completamente integrado, sin aparición de signos de inflamación (216). Posteriormente, en un estudio de características similares, comprobaron la curación completa de los defectos a través de parámetros clínicos y radiológicos (217). Otros autores, en cambio, obtuvieron mejores resultados en la formación de hueso en defectos periodontales cuando emplearon biovidrio, o bien biovidrio mezclado con HA (218).

En defectos periimplantarios, Schwarz et al. (2006) compararon la efectividad de HA nanocrystalina y de origen bovino en defectos periimplantarios y concluyeron que con el empleo de ambos materiales producía una disminución de la profundidad de sondaje periimplantario y un aumento del nivel de inserción clínico, sin existir diferencias significativas entre los mismos (219). Sin embargo, en una revisión bibliográfica posterior indican que no existe evidencia científica sobre cuáles pueden ser las técnicas más efectivas para el tratamiento de la periimplantitis, indicando que el uso de técnicas de regeneración ósea guiada con materiales de injerto óseo como la HA, más costosas y complejas que el desbridamiento subgingival, no garantiza mejores resultados (220).

Gali et al. (2017), realizaron un estudio prospectivo en el que emplearon HA mezclada con médula ósea para regenerar defectos presentes en 9 pacientes a causa de la resección de lesiones osteolíticas en maxilar y mandíbula. Transcurridos 6 meses, comprobaron radiográficamente los cambios de densidad, así como los resultados

clínicos. Observaron que existía una incorporación del injerto con el hueso, y ningún paciente presentó complicaciones como infección, pérdida del injerto, o presencia de dehiscencias (221).

En la actualidad, las investigaciones giran en torno al desarrollo de compuestos poliméricos-cerámicos con forma de andamio para la regeneración ósea. De este modo se combinan las propiedades de bioactividad y resistencia mecánica aportadas por la cerámica, y biodegradabilidad, dureza y flexibilidad otorgadas por el polímero. Estos andamios se confeccionan mediante 3D printing, y los polímeros más comúnmente empleados son la policaprolactona (PCL), polilactida (PLA), polipropileno fumarato (PPF) (222–224).

Desafortunadamente, la HA, como el resto de los sustitutos óseos, carece de propiedades osteogénicas y osteoinductivas, por lo que habitualmente se emplean como portadores de sustancias que sí poseen estas características. Farokhi et al. (2013), diseñaron un andamio de HA/fibroína de seda/PLGA por liofilización y electrohilado, para controlar la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Descubrieron que este sistema tenía suficiente bioactividad y podría promover la proliferación. Además, la prueba in vivo indicó la formación de hueso (225). Nandi et al. (2015) realizaron defectos óseos en conejos para rellenarlos con HA coralina porosa (70-75%) (grupo I), con dicha HA coralina cargada con IGF-1 (grupo II) y cargada con BMP-2 (grupo III). A los 90 días comprobaron radiográfica e histológicamente que la radiolucidez era inferior en los grupos II y III, así como la formación de nuevo tejido óseo. Los resultados mostraron que la liberación de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) fue más sostenida que de BMP-2 (226). Ding et al. (2016) fabricaron andamios de HA y fibroína de seda, que fueron cargados con BMP-2 de modo que garantizaban una liberación sostenida de forma programada. Según sus resultados afirman que estos andamios biomiméticos que permiten una liberación sintonizable de BMP-2 proporcionan entornos favorables para la regeneración ósea (227).

Diversos estudios se han centrado en compuestos que contienen HA dopada con iones como el Si, Zn, Mg, Sr, Co, nanopartículas de Ag, grafeno u óxido de grafeno, nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4 , Fe_2O_3), o nanotubos de carbono. Cuando se cargan nanopartículas de HA de Zn o Si, mejora su biocompatibilidad, incrementa la diferenciación celular osteogénica y se produce una mayor reabsorción del material (228,229). Las nanopartículas de Ag incluidas en las esponjas de HA proporcionan propiedades antibacterianas frente a cepas como *Escherichia Coli* o *Streptococcus Aureus*, lo que puede prevenir infecciones bacterianas asociadas a la colocación de los implantes (230). El refuerzo de la HA con nanotubos de carbono se ha empleado para mejorar las propiedades mecánicas de la cerámica en la sustitución de grandes defectos óseos, o bien en lugares que son sometidos a carga. En los ensayos in vitro demostraron que la presencia de los nanotubos de carburo no producía efectos citotóxicos sobre las células osteoblásticas, aunque la viabilidad celular disminuyó cuando aumentaba la concentración de este composite, indicando que puede ser citotóxico a elevadas concentraciones. De todos modos, son necesarios más estudios en este campo (231). Algunos estudios mostraron que la aplicación de materiales magnéticos promueve la proliferación de fibroblastos, lo que provoca un aumento en el contacto entre las células y el material de injerto óseo, favoreciendo así la regeneración ósea (232).

La aplicación de la HA como recubrimiento de implantes dentales ha sido ampliamente comprobada. Para mejorar la propiedad de biocompatibilidad y mejorar la osteointegración de los implantes metálicos, se recubren de materiales cerámicos, fundamentalmente la HA. La biocompatibilidad de los recubrimientos es dependiente de la técnica de preparación de los mismos; que puede ser mediante pulverización de plasma, deposición por electroforesis, deposición por láser pulsado, deposición de sol-gel, mediante bombardeo, técnica deposición asistida mediante haces de iones, y otras. En ocasiones se cargan los recubrimientos de HA con Zn para mejorar dicha biocompatibilidad (233). Por otra parte, las propiedades mecánicas de los recubrimientos dependen de parámetros como su densidad, porosidad, composición química, cristalinidad, etc. Para mejorar estas

propiedades mecánicas, se ha probado a añadir a los recubrimientos nanotubos de carbono, grafeno u óxido de grafeno (234). Otros autores han buscado la manera de dotar a los recubrimientos de propiedades antibacterianas, por tanto, se han cargado con antibióticos que a nivel local previenen las infecciones bacterianas tras la implantación del implante. Sin embargo, la liberación de estos fármacos no puede realizarse de forma prolongada cuando se emplean con HA, por lo que se ha probado a introducir factores antibacterianos inorgánicos, especialmente Ag; aunque también se ha probado con otras sustancias como magnetita. Las investigaciones futuras en esta aplicación giran en torno al empleo de sustancias inductoras de la formación ósea contenidas en los recubrimientos (235,236).

La aplicación de la hidroxiapatita como portadora de fármacos no se limita sólo al ámbito de la cirugía oral. El uso de nanopartículas de HA cargadas de moléculas que se emplean para la administración de fármacos o para el diagnóstico por imagen ha suscitado un gran interés en los últimos años. La HA nanocristalina porosa es un buen sistema de liberación de medicamentos de forma controlada, sobre todo en trastornos óseos como la osteoporosis o el cáncer. Las sustancias comúnmente empleadas son antibióticos, antiinflamatorios, sustancias anticancerígenas, sustancias anti-osteoporóticas, vitaminas, hormonas, proteínas, factores de crecimiento (237,238). La HA que se emplea para este fin necesita de una morfología determinada que habitualmente consta de microesferas mesoporosas, rombos mesoporosos, nanobarras, nanotubos, partículas fusiformes, etc. que poseen porosidades de diferentes tamaños y una superficie específica que se sitúa entre 20 y 90 m²/g. Estas estructuras controladas se consiguen generalmente con la adición de aditivos orgánicos, como aminoácidos o surfactantes. También se combinan con otras sustancias para mejorar sus propiedades, como sílice o silicato mesoporosos que son agentes nucleantes muy efectivos, o los iones de plata para mejorar las propiedades antibacterianas, o bien polímeros biocompatibles para mejorar la biocompatibilidad y las propiedades antimicrobianas (239,240).

1.3.4.2- El fosfato tricálcico (TCP)

El TCP, se presenta en dos formas; α -TCP, que se forma cuando se sinteriza a temperaturas superiores de 1125 °C, y β -TCP, que se produce a temperaturas por debajo de 1125 °C. El β -TCP es más estable a temperatura ambiente y menos soluble en agua (166). En cambio, su biodegradación es más rápida que la de α -TCP, debido a que esta forma se hidroliza parcial o totalmente en HA (241). Ambas formas de TCP presentan una tasa de reabsorción mayor que la HA. El aumento de la concentración de Ca y P a causa de su disolución resulta ventajosa para la mineralización de nuevo hueso. El reemplazo total de este material por hueso neoformado a causa de su disolución fisicoquímica y de su fragmentación sin dejar residuos se produce entre los 6-12 meses tras su implantación (242). Dicha degradación comienza en los cuellos que conectan las distintas partículas de polvo y que se forman en el sinterizado (243). En el estudio realizado por Martínez et al. (2015); tras la implantación de β -TCP en la calota craneal de conejos New Zealand, observaron a las 32 semanas la disgregación del material, pues aparecen componentes del mismo en la médula ósea. A las 56 semanas, los fragmentos de β -TCP ya presentan un grado de reabsorción muy avanzado (2). A causa de esta rápida disgregación, algunos autores afirman que se produce una reducción en la formación de hueso nuevo a partir de los 6 meses cuando se emplea este material, debido a que no proporciona un sustrato estable para la adhesión y función de los osteoblastos (244).

El β -TCP, fosfato cálcico pionero en ser empleado como sustituto óseo, tiene su primera referencia en 1920 a partir de los estudios de Albee y Morrison. En ellos reportaron que la inyección de este material aceleraba la unión en una fractura ósea (245). Sus características de biocompatibilidad, conductividad y reabsorbilidad se han comprobado en múltiples estudios en los que se ha empleado el β -TCP en la reparación de defectos óseos en diferentes especialidades como la medicina (especialmente traumatología y ortopedia), veterinaria y odontología (246–248). Se trata de un material en el que los osteoblastos, los osteoclastos, los macrófagos, las células multipotenciales y las células madre derivadas de la médula ósea son

capaces de proliferar, y que proporciona una matriz adecuada para el crecimiento óseo (249,250). En algunos animales, se ha mostrado que el β -TCP poroso presenta capacidad osteoinductiva por la actividad de las células de la matriz cuando es implantado en músculos dorsales de perros (251).

El β -TCP es débil a las fuerzas de tensión y cizalla pero es resistente a la compresión (252). Comercialmente, está disponible en formas porosas sólidas, en granulado o bloques. Las formas porosas presentan una fuerza de compresión y tensión similar a la del hueso esponjoso.

En la línea de la ingeniería tisular, se considera que las cerámicas, como el β -fosfato tricálcico, debido a su gran afinidad por las proteínas, pueden ser utilizadas como vehículos para medicamentos y sustancias, siempre que se introduzcan en ellas macroporosidades (253). Fahimipour et al. (2017), fabricaron una esponja de gelatina, alginato y β -TCP que contenía factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) empleando un modelo de diseño por ordenador y una impresora 3D. Los resultados in vitro mostraron el incremento dos veces superior en la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana tras 10 días. El cultivo de osteoblastos en las esponjas mostró que tienen lugar la viabilidad, adhesión y proliferación celular (254).

El β -TCP se ha empleado solo o junto con otros injertos, como el hueso autólogo del paciente o la hidroxiapatita; pero también con otros materiales como factores de crecimiento (255), plasma rico en plaquetas (PRP) o fibrina (PRF) (256), matriz ósea enriquecida con células mesenquimales, esponjas de gelatina y fibroína de seda, con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas, osteogénicas y osteoinductoras (257).

Los análisis histológicos han demostrado que el β -TCP proporciona una reducción de los defectos óseos periodontales y una ganancia del nivel de inserción, pero no es capaz de formar nuevo tejido conectivo, cemento y hueso. Por ello, se ha propuesto emplear su capacidad de andamio osteoconductor para portar factores de

crecimiento. Stavropoulos en 2011 mostró, a partir de los resultados de un ensayo clínico multicéntrico randomizado, que la combinación de factor de crecimiento y diferenciación recombinante humano 5 con β -fosfato tricálcico iguala los resultados que ofrece la combinación de hueso autógeno y β -fosfato tricálcico en elevaciones de seno; pudiendo eliminarse por tanto el uso de hueso autógeno y disminuyendo las complicaciones asociadas al mismo (258). Rodrigues et al. (2017) realizaron defectos de 5 mm de diámetro en la calota craneal de ratas y rellenaron unos defectos con β -TCP solo, y otros con β -TCP combinado con 5 mg de BMP-2. A los 5, 10 y 15 días realizaron análisis histomorfométrico e inmunohistoquímico en los que observaron que la presencia de BMP-2 promueve una reabsorción más rápida del material, pero no obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de nuevo hueso formado entre ambos grupos (259). Por otro lado, cuando emplearon factor de crecimiento derivado de plaquetas BB recombinante humano (rhPDGF-BB) en combinación con β -TCP, los resultados mostraron una mayor cantidad de hueso formado a los 6 meses en relación con la implantación de β -TCP solo (260). El uso de estos materiales ofrece resultados prometedores en el tratamiento de recesiones gingivales. Shujaa Addin et al. (2017) emplearon esponjas de gelatina y β -TCP cargadas con factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) o solución salina tamponada con fosfato para cubrir recesiones óseas vestibulares de 6 mm generadas en caninos maxilares de perros Beagle. Transcurridas 8 semanas desde la cirugía, la raíz se cubrió completamente en ambos grupos, aunque en el grupo regenerado con las esponjas cargadas con FGF-2, además de mostrar una mayor cantidad de hueso nuevo, también había mayor regeneración de tejido blando y cemento (261).

También se ha probado la combinación de β -fosfato tricálcico poroso con células osteoprogenitoras derivadas de la médula ósea, esto da lugar a un material compuesto con una buena actividad osteogénica, mejores propiedades mecánicas y menor biodegradabilidad (262). Sin embargo, su uso en la Unión Europea se encuentra muy restringido por la ley. Gan y cols. (2008) utilizaron una combinación de β -fosfato tricálcico y células madre derivadas de la médula ósea para la fusión espinal posterior en 41 pacientes con éxito clínico en el 95% de los

casos (98); y Shayesteh y cols. (2008) utilizaron una combinación de β -fosfato tricálcico/hidroxiapatita con células madre derivadas de la médula ósea para la elevación de seno maxilar en 6 pacientes con éxito clínico en el 93% de los casos de los 30 implantes colocados (263). Posteriormente, Janko y cols. (2017) comprobaron la actividad génica a 1 semana y la formación ósea a 8 semanas en defectos óseos creados en fémur de rata que fueron rellenados con diferentes andamios sembrados con células mononucleares de la matriz ósea. Para ello emplearon β -TCP, matriz ósea desmineralizada humana y cerámica de hidroxiapatita de hueso esponjoso bovino. Como control se tomó el hueso autógeno. Con ningún sustituto se consiguieron los mismos niveles de formación de puentes y callos óseos como los alcanzados con el autoinjerto, a pesar de que en todos había expresión génica regenerativa (presencia de BMP2, RUNX2, VEGF, SDF-1 y RANKL) (264).

En lo que respecta a la combinación del β -TCP con plasma rico en plaquetas, existen trabajos que obtuvieron buenos resultados histológicos e histomorfométricos, así como de reabsorción del material, a las 6, 8 y 12 semanas tras su implantación para la regeneración de defectos mandibulares generados en perros Beagle (265) y a las 8 semanas en cerdos (266). Sin embargo, otros autores no obtuvieron diferencia en la cantidad de nuevo hueso formado tras 6 meses desde la implantación de bloques porosos de β -TCP enriquecidos con plasma rico en plaquetas o con fibrina rica en plaquetas, frente a bloques porosos de β -TCP que no fueron enriquecidos, en la elevación de seno maxilar. Tampoco existieron diferencias significativas en el tejido blando, ni en las densidades de osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y vasos sanguíneos. Las células osteoprogenitoras e inflamatorias eran superiores en el grupo de β -TCP enriquecido con fibrina rica en plaquetas. Por tanto, consideraron que añadir PRF o PRP al β -TCP no ofrece resultados superiores en la regeneración ósea en relación con el uso de este biomaterial por sí solo (256,267).

Para entender cómo se produce la reabsorción del β -TCP y en consecuencia su transformación a hueso, se desarrollaron diversos

estudios. El mecanismo de desintegración del β -TCP se produce a través de la propia disolución del material y de la desintegración celular mediada fundamentalmente por los osteoclastos. Transcurridas entre dos y tres semanas tras la implantación del sustituto β -TCP, la reabsorción del material se produce desde la periferia al centro del mismo. Dicha desintegración depende de diversos factores. Entre ellos figuran la cantidad de material implantado, la porosidad y el tamaño de las partículas, el tipo de hueso de la zona receptora, la edad del paciente, etc. (268).

Cuando se coloca un implante de β -TCP en las proximidades de hueso sano, en primer lugar, su superficie es colonizada por proteínas y células, y posteriormente por tejido fibrovascular con intensa actividad angiogénica y ribetes de células multinucleadas que proceden a la remoción del material hacia el interior del mismo. Este avance hacia el interior del implante es dependiente de la porosidad del mismo. En segundo lugar, la matriz proteica extracelular que recubre los fragmentos de material se mineraliza, quedando de este modo el β -TCP en el interior de la matriz (4). Para el estudio de la transformación de las partículas de β -TCP a hueso, Zerbo et al. (2006) tomaron biopsias de hueso transcurridos 6 meses desde la elevación de seno y observaron que además de hueso neoformado en las partículas, también encontraron tejido conectivo blando. Para comprobar la cantidad de células osteoprogenitoras presentes en este tejido, realizaron inmunotinciones en las secciones histológicas con un anticuerpo Runx2/Cbfa1, un factor de transcripción esencial para la diferenciación osteoblástica. Otras secciones se tiñeron para comprobar la actividad de la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) y de este modo identificar células con capacidad osteoclástica. Se encontraron células de tejido conectivo de Runx2/Cbfa1 positivas en abundancia en todas las partículas de TCP y alrededor de las mismas. TRAP fue negativa para osteoclastos multinucleados, y positiva para células mono- y binucleadas. Estos datos sugieren que las partículas de TCP atraen a las células osteoprogenitoras que migran a los microporos del material. La falta de células grandes multinucleadas sugiere que la reabsorción del TCP por osteoclastos desempeña un papel menor en su sustitución por el hueso. La disolución química, posiblemente favorecida por un alto

metabolismo celular en las partículas, parece ser la causa predominante de la degradación del TCP. La abundancia de células positivas de Runx2/Cbfa1 indicaría que con un mayor tiempo de cicatrización habrá más deposición de hueso en estas partículas (269).

En 2011, Zaho et al. (2004), realizaron un estudio histológico y analizaron la expresión génica que tenía lugar tras la implantación de β -TCP en defectos mandibulares de 4.5 mm de diámetro y 8 mm de longitud generados en perros Beagle transcurridos 4, 7 y 14 días desde la cirugía. En los defectos rellenados con β -TCP, a los 4 días observaron la presencia de fibroblastos, células inflamatorias y linfocitos en la zona de implantación; a los 7 días, encontraron que había simultáneamente hueso nuevo y tejido conectivo para, a los 14 días estar el defecto cerrado completamente. En los defectos que no se introdujo material, la cantidad de hueso nuevo a los 7 y 14 días fue inferior y limitado a los márgenes del defecto. Los perfiles de expresión genética fueron similares entre ambos grupos a los días 4 y 7, pero difirieron en el día 14, en el que se reflejó la presencia de osteoblastos ocupados en la formación ósea y osteoclastos encargados en la reabsorción del material. Con respecto a la codificación genética, a los 4 días encontraron genes que corresponden con la respuesta de fase aguda y reparación tisular primaria tras la cirugía, comunicación celular y regulación de la proliferación celular. A los 7 y 14 días, observaron una actividad de diferenciación celular, desarrollo esquelético, de formación de biomineral, osificación, regulación de la mineralización ósea y remodelado óseo. También una expresión de genes involucrados en procesos biológicos como proliferación y adhesión celular, apoptosis, actividad de las citoquinas y de factores de crecimiento, señal de transducción, proteólisis, respuestas inflamatoria e inmune, respuesta al estrés (270).

En esta línea, Pereira et al. (2017) realizaron un análisis histomorfométrico e inmunohistoquímico para la proteína Runx2/Cbfa1 y para el VEGF, de biopsias tomadas a los 6 meses desde la realización de 33 elevaciones de seno maxilar en las que emplearon β -TCP solo, hueso autólogo solo y β -TCP mezclado con hueso

autólogo. La cantidad de hueso formado no mostró diferencias significativas entre los tres grupos. El grupo de β -TCP mezclado con autoinjerto mostró una actividad celular alta y presencia de hueso inmaduro, mientras que los grupos de β -TCP y autoinjerto presentaron hueso maduro. Con estos resultados concluyeron que el β -TCP es un buen sustituto óseo alternativo al hueso autólogo (271).

La caveolina-1 es una proteína de la membrana plasmática presente en las caveolas de células no musculares, como por ejemplo, osteoblastos y en las células del cartílago de la articulación de rodilla. Chou et al. (2012) intentaron comprender su papel en la homeostasis del hueso y de la respuesta de este frente a un andamio de β -TCP. Al emplear β -TCP para regenerar un defecto óseo, encontraron que en los primeros 14 días había una sobre-expresión de caveolina-1 por los osteoblastos comparado con las zonas en las que no se empleaba sustituto óseo. Determinaron que la caveolina-1 interviene en la diferenciación de los osteoblastos y en la calcificación y mineralización de la matriz, así como en la producción de proteínas de la matriz (272).

En otro estudio, empleando la micromatriz de ADN con el sistema Afymetrix GeneChip®, observaron niveles altos de mRNA de conexina 43 en defectos que habían sido rellenados con β -TCP. Estas proteínas tienen como función comunicar diferentes células entre sí y también interaccionar con proteínas intracelulares de señalización y andamiaje, y se sabe que juegan un papel importante en la osteogénesis. Hayashi et al. (2011) concluyeron por tanto, que la estimulación de la expresión de la conexina 43 debida al empleo de β -TCP como sustituto óseo, acelera el mecanismo de formación y curación óseas (273).

Existen diversos estudios con animales en los que se ha empleado el β -TCP para regeneración ósea. Artzi et al. (2004) demostraron la curación ósea de defectos mandibulares experimentales en perros utilizando β -fosfato tricálcico para su relleno, en un estudio de seguimiento durante 24 meses en el que se realizaron análisis histomorfométricos de los cortes histológicos a los 3, 6, 12 y 24 meses (274). En posteriores trabajos, se ha mostrado que la osteoconducción se manifiesta de manera muy temprana, a los 4 días tras la implantación

del material, reemplazándose por hueso nuevo y reduciéndose su cantidad significativamente a los 56 días. Este es el caso de Kondo y cols., 2005 (275), que implantaron en el cóndilo femoral de ratas β -TCP de alta pureza. La seguridad y estabilidad de este material se ha comprobado a largo plazo en un estudio realizado por Ye y cols. (2007) en el que implantaron piezas porosas de HA y β -TCP en los músculos dorsales de minipigs. A los 4.5 años evaluaron que el hueso nuevo no había desaparecido ni había sufrido un crecimiento incontrolado, pues estaba autoconfinado. Además, los tejidos circundantes carecían de inflamación o células tumorales (276). No obstante, otros autores reportaron que la neoformación ósea era más rápida e intensa cuando se empleaba hueso autólogo. Tras 6 meses de implantación, el material todavía permanecía sin ser completamente reabsorbido (277). En el estudio realizado por Frota y cols. (2011), no se encontraron diferencias significativas en la histología entre los defectos sin injerto óseo y los defectos que fueron rellenados con β -TCP a 7, 15 y 30 días; ambos realizados en la calota de ratas (278). Estos resultados contrastan con los obtenidos en el estudio de David S.H. Lee (2016), en el que fabricaron β -TCP de alta pureza con un tamaño de partícula entre 250 y 600 nm, una porosidad del 75% y una superficie específica de 2.5 m²/g. Implantaron dicho material en defectos mandibulares de perros Beagle y a las 12 semanas, observaron que se producía un rápido incremento de hueso acompañado de una reabsorción del material en relación a los defectos en los que no se había empleado sustituto óseo alguno (279).

A nivel clínico, en humanos, el β -TCP ha sido ampliamente utilizado en diferentes procedimientos quirúrgicos con el fin de regenerar hueso. Ejemplo de ellos, son las elevaciones del seno maxilar para la posterior colocación de implantes dentales. Siempre se ha afirmado que el hueso del propio paciente es el material ideal en la técnica de elevación sinusal. Esto concuerda con los resultados del estudio de Zerbo et al. (2004), en el que para realizar la elevación de seno a 9 pacientes, emplearon partículas porosas de β -TCP de entre 1 y 2 mm (Cerasorb®) y hueso autógeno del paciente obtenido del mentón. El porcentaje de osteoide a los 6 meses fue mayor para las zonas de

injerto con β -TCP, lo que indica la formación de hueso; pero la cantidad de hueso lamelar formado era menos de la mitad que el formado en las zonas regeneradas con autoinjerto. Por ello, a pesar de considerar el β -TCP un material adecuado para el aumento del suelo sinusal, afirmaron que la regeneración ósea se produce con mayor lentitud que en caso de emplear hueso autólogo (280). En contraste a estos resultados, el estudio de Zijdeveld et al. (2005) no muestra diferencias en el porcentaje de éxito de los implantes insertados a los 6 meses de cicatrización en elevaciones sinusales uni y bilaterales comparando el hueso autólogo y el β -fosfato tricálcico tras 12 meses de seguimiento (281). Martínez et al. (2010), reportaron que tras 8 meses después de la cirugía, el relleno del defecto era del 100% (282). Además de los éxitos clínicos, se ha demostrado mediante histología e histomorfometría que el hueso autólogo y el β -fosfato tricálcico no presentan diferencias significativas en la regeneración ósea del suelo maxilar y en su adecuación en altura para la inserción posterior de los implantes dentales (283,284). Tetsch et al. (2010), elaboraron un estudio retrospectivo en el que evaluaron los resultados clínicos y radiológicos de 1270 implantes colocados tras la realización de la elevación de seno con hueso bovino, β -TCP y hueso autógeno. El porcentaje de éxito clínico fue del 97.1% y no encontraron diferencias entre los distintos materiales empleados (285). En la misma línea, Markovic et al. (2016), realizaron un estudio clínico y radiográfico prospectivo y randomizado, en el que compararon la estabilidad y el éxito de 180 implantes colocados en 45 pacientes, de manera simultánea a la realización de la elevación de seno con osteotomos transcurridos dos años desde la cirugía. En el primer grupo no se colocó injerto óseo, en el segundo emplearon β -TCP, y en el tercer grupo, hueso bovino desproteinizado (DBB) y en un cuarto una mezcla de β -TCP y DBB. El éxito implantológico y protético fue del 100%. La estabilidad de los implantes, medida con Osstell®, mostró valores ISQ sin diferencias significativas entre los diferentes grupos, siendo el efecto del tiempo una variable que provocó aumento en los valores ISQ de forma significativa a medida que éste transcurría. Las imágenes obtenidas con Cone Beam Computed Tomography (CBCT), mostraron la presencia de hueso nuevo en la zona apical de los implantes a los 6 meses. Con el

transcurso del tiempo, todos los grupos sufrieron contracción del volumen óseo; tras el primer año, la contracción más acusada fue para el grupo de β -TCP. Este descenso de volumen a los dos años fue más acusado para el grupo en el que se había empleado DBB, siendo la pérdida inferior en el grupo en el que se combinaron β -TCP y DBB (286).

El β -TCP también ha sido empleado para la reparación de defectos óseos en la zona alveolar o en técnicas de preservación alveolar y la regeneración de defectos óseos periodontales. Horch y cols. (2006) trataron distintos tipos de defectos en 152 pacientes con β -fosfato tricálcico aislado o mezclado con hueso autógeno. A los 12 meses, la histología mostró una completa formación ósea y la radiología un completo reemplazo del material por hueso nuevo, indicando que es un material adecuado para utilizar en la región alveolar (241). En 2009, Horowitz et al., realizaron la técnica de preservación alveolar empleando β -TCP y una membrana barrera. Transcurridos 6 meses de la cirugía, colocaron los implantes y determinaron clínica, radiográfica e histológicamente que la mayor parte del material se había reabsorbido siendo sustituido por hueso nuevo. La cantidad y densidad del mismo era suficiente para la colocación de los implantes (287). En una revisión bibliográfica posterior, concluyeron que no hay evidencia de que exista un material de injerto óseo superior al β -TCP en lo que a formación de hueso se refiere en la técnica de preservación alveolar. El sulfato cálcico y el β -TCP se reabsorben antes que otros materiales como el xenoinjerto (288).

1.3.4.3- Estudios comparativos sobre la eficacia de la Hidroxiapatita y el Fosfato Tricálcico en la formación de hueso

En diversos estudios se ha comparado la efectividad en la neoformación ósea de la HA y el β -TCP cuando se emplean como sustitutos óseos. También se ha ahondado en cómo responden los tejidos, así como se produce la reabsorción de estos materiales durante dicho proceso.

Ogose y cols. (2005) realizaron un estudio a largo plazo en el que utilizaron HA y β -TCP de elevada pureza para regenerar zonas de hueso en las que se había practicado la resección de un tumor óseo. La porosidad y características de los materiales comerciales presentaban ligeras diferencias; la HA, que fue empleada en 23 pacientes, había sido sinterizada a 900 °C, y presentaba una porosidad del 70%, y un tamaño de poro entre 90 y 200 μm . El β -TCP, empleado en 30 pacientes, había sido sinterizado a una temperatura de 1050 °C, su porosidad era del 75% con un tamaño de poro de entre 100 y 400 μm . Con ningún material se observaron problemas de infección postoperatoria ni complicaciones tóxicas. Las radiografías postoperatorias mostraron zonas radiolúcidas entre el margen del defecto óseo y el material, que desaparecieron a la semana 16 en las zonas en las que se empleó HA, con elevada variabilidad entre los pacientes (entre la octava y la vigesimocuarta semana), no llegando a desaparecer en 2 de los pacientes tratados con este material. Tras 130 meses de seguimiento, no hubo evidencia de una degradación completa de la HA. En el β -TCP, la reabsorción del material se produce transcurridas 9 semanas de media (con un rango de entre 4 y 16 semanas), siendo reemplazado por hueso trabecular. Estos autores concluyeron que el uso de β -TCP para regenerar las lesiones causadas por tumores óseos presenta ventajas frente al uso de la HA por su mayor osteoconductividad. (289)

En un estudio posterior, realizado en 2006 por Jense et al., fue implantado hueso autólogo, hueso bovino anorgánico (ABB) y β -TCP en defectos generados en mandíbulas de 12 cerdos adultos. Realizaron estudios histológico e histomorfométrico transcurridas 1, 2, 4 y 8 semanas. A partir de los resultados obtenidos, concluyeron que el uso de ambos materiales decelera la regeneración ósea en comparación con el empleo de autoinjerto en las primeras semanas. No obstante, a largo plazo ambos materiales mostraron una completa integración en el tejido óseo. El β -TCP sufrió una reabsorción completa, mientras el ABB permaneció con mayor estabilidad. (266)

Sun y cols. (2009) implantaron cilindros porosos de HA y β -TCP con la misma estructura tridimensional y una porosidad del 75%, en cóndilos femorales de conejos New Zealand. Realizaron un estudio

histomorfométrico y con micro-CT de las zonas injertadas transcurridos 1, 3, 6 y 12 meses desde la cirugía. Con ello, determinaron la cantidad de hueso neoformado y el ratio de degradación del material. Las observaciones histológicas mostraron que se produjo hueso en el interior de los poros de los cilindros a los 3 meses de haber sido implantados. Los patrones de regeneración de hueso nuevo fueron diferentes para cada material. La macroarquitectura de la HA apenas sufrió modificaciones, aun así se produjo una acusada formación de hueso lamelar sobre la misma. En el grupo en el que se había empleado β -TCP, la degradación del material a los 3 meses produjo una modificación en la macroarquitectura de los cilindros; adquiriendo a los 12 meses una morfología trabecular que se integraba con el hueso esponjoso, por lo que se volvía imposible distinguir la arquitectura original del cilindro. La formación de hueso nuevo entre el mes 1 y 3 fue significativamente mayor para el grupo en el que se había empleado β -TCP; sin embargo, a partir de los 6 meses no había diferencia en la cantidad de hueso para ambos materiales. Transcurridos 12 meses, encontraron diferencias significativas de nuevo en la cantidad de nuevo hueso formado, siendo en este caso superior para el grupo en el que se había empleado HA. Con estos resultados concluyeron que, para estadíos tempranos de regeneración ósea, el β -TCP con porosidad del 75% favorecía la formación de hueso nuevo en relación con la HA de igual porosidad. (290)

En 2012, Hwuang et al., realizaron cuatro defectos críticos de 8 mm de diámetro en la calota craneal de conejos. Estos se rellenaron con β -TCP, HA, fosfato cálcico bifásico (BCP) y, en el cuarto orificio, mantuvieron el coágulo sanguíneo. A las 4 y 8 semanas realizaron un estudio histológico e histomorfométrico de los diferentes injertos empleados. Observaron que la mayor fracción de hueso nuevo se encontraba en el grupo en el que se había empleado en BCP, tanto a las 4 como a las 8 semanas. El material que sufrió una mayor reabsorción fue el β -TCP. (291)

En un estudio actual, Sakai et al. (2016), compararon la resorbabilidad y el comportamiento de disolución del fosfato

octacálcico (OCP), el β -TCP y la HA bajo condiciones fisiológicas. Para ello, implantaron dichos materiales en bolsas subcutáneas de rata durante 8 semanas, y los sumergieron en fluido corporal simulado (SBF). Mientras que el OCP se convertía parcialmente en cristales apatíticos, observaron que el β -TCP y la HA no sufrieron cambios, sin embargo, sí se detectó la adsorción de carbonato y proteínas. El grado de sobresaturación de la disolución en el SBF permaneció ligeramente sobresaturado para OCP y β -TCP. Estos autores sugieren que en el medio biológico la reabsorción de estos materiales no se produce simplemente por la disolución de los mismos, sino que la actividad osteoclástica ejerce un papel fundamental (292).

En un trabajo previo realizado por el equipo de investigación sobre biocerámicas del Instituto de Cerámica de Galicia, se realizó un estudio longitudinal y transversal para evaluar las diferencias en la formación de hueso y en la reabsorción del material cuando se emplean dos materiales comerciales; por un lado, hueso bovino desproteínizado (DBB. Bio-Oss, Geistlich, Suiza), y por otro, β -TCP (KeraOs, Keramat, España). Ambos materiales, con un tamaño de partícula de entre 0.25 y 1 mm, presentan buena osteoconductividad y biocompatibilidad. Como es sabido, el primero es un xenoinjerto que posee un área de superficie idónea para la aposición del hueso sobre la misma conformando un composite de hueso-DBB con excelentes propiedades mecánicas; la controversia de su empleo radica en su bajo grado de reabsorción. El segundo, es un sustituto óseo con mayor velocidad de reabsorción a causa de su solubilidad in vivo y de la degradación por la actividad de células multinucleadas. Dicha degradabilidad puede ser controlada en la síntesis del material modificando la porosidad, el tamaño de poro, la granulometría, etc. Estos materiales se implantaron en defectos realizados en calotas craneales de conejos New Zealand, que tenían un tamaño subcrítico de 7 mm de diámetro y en los que se eliminó la tábula externa y la tábula interna, dejando expuesta la duramadre íntegra. Los sustitutos se colocaron de forma aleatorizada; a un lado de la sutura media se colocó un material en un orificio, dejando el otro defecto vacío (control), y al otro lado se colocó el otro material, dejando el defecto restante sin sustituto óseo (control). La estabilización de los materiales se realizó con membrana colágena reabsorbible (BioGuide. 25x25 mm.

Geistlich, Suiza). El análisis histomorfométrico se realizó transcurridas 1, 4, 8, 16, 32 y 52 semanas desde la cirugía. Los resultados del estudio longitudinal mostraron un marcado crecimiento de hueso entre la primera y cuarta semana, más acusado en los grupos control y en los que se había empleado β -TCP. Sin embargo, los resultados estadísticos se mostraron significativos a partir de la semana 16 para los tres grupos (DBB, β -TCP y control). Desde la semana 16 a la 52, continuó el incremento en la formación de hueso, pero los resultados ya no fueron estadísticamente significativos. También se observó una diferencia entre la zona interna del defecto (más próxima a la duramadre) y la zona externa (en contacto con la membrana), que fue mayor en esta última para aquellos defectos en los que se empleó DBB y β -TCP, lo que mostró la capacidad de inducir la formación ósea de la membrana. Estas diferencias no se observaron, sin embargo, en los defectos en los que no se había empleado material de injerto óseo. La reabsorción de material mostró diferencias entre los dos sustitutos empleados. El DBB sufrió un descenso marcado entre la semana 8 y 16 y, a partir de ese momento, no hubo significación estadística en su reabsorción. En el β -TCP el descenso fue más rápido entre la semana 1 y la 16, reduciéndose la velocidad del mismo a partir de ese momento. La reducción del tejido blando fue significativa en las primeras semanas, entre la semana 1 y la 4, debido al descenso del edema postoperatorio. El estudio transversal, mostró diferencias significativas en la cantidad de hueso formado entre los distintos grupos a la semana 32, siendo superior para el β -TCP que para el grupo control y para el DBB. En lo que respecta a la permanencia del material, la cantidad de β -TCP fue menor que para el DBB a partir de la semana 16, permaneciendo hasta la semana 52. La cantidad de tejido blando fue menor para los grupos en los que se emplea material de injerto óseo en comparación con el grupo control, debido a la presencia de la suma de sustituto óseo y hueso neoformado. A partir de estos resultados se concluyó que el patrón de regeneración ósea difiere para los dos sustitutos óseos, siendo más rápida en los primeros estadios para DBB, aunque a largo plazo la fracción de hueso es menor que cuando se emplea β -TCP debido a la permanencia del material. (2)

1.3.5- INFLUENCIA DE LA MACROPOROSIDAD, MICROPOROSIDAD Y ESTRUCTURA DE SUPERFICIE DE LAS BIOCERÁMICAS EN LA FORMACIÓN DE HUESO

La forma en la que se produce la unión de los tejidos a las biocerámicas depende de diferentes factores, fundamentalmente de su composición química y su estructura, que abarca la macroporosidad y sus interconexiones y la estructura de superficie o microporosidad. La solubilidad del material y su reabsorción en el cuerpo dependen en mayor medida de su composición química, en concreto de la relación Ca:P; y la adhesión y proliferación de las células mesenquimales sobre las biocerámicas vienen determinadas por la rugosidad superficial de las mismas (293). Otros factores que intervienen directamente en la penetración celular, la difusión de nutrientes y, en definitiva, el crecimiento óseo, son el tamaño de grano, la porosidad y tamaño de poro, el dopaje químico, etc. (294).

La respuesta celular es dependiente de las modificaciones en la concentración de los iones Ca^{2+} y PO_4^{2-} en el entorno. El primero interviene en la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos y en la expresión de proteínas que incorporan dichos iones a la matriz. El segundo está implicado en la expresión de genes que se relacionan con la mineralización de la matriz ósea, como son la osteopontina y la proteína de la matriz GLA. Además, los iones de pirofosfato promueven la mineralización del colágeno tipo I. Se puede considerar que una cerámica con mayor solubilidad puede provocar una rápida reabsorción osteoclástica; pero una cerámica demasiado soluble genera un gradiente de iones calcio que resulta perjudicial para la actividad de los osteoclastos. La solubilidad del material afecta al patrón de reabsorción osteoclástica, con el uso de β -TCP las lagunas óseas presentan morfología de cadena discontinua, formando pequeñas islas. Con los fosfatos cálcicos bifásicos, las lagunas forman una gran cadena continua. En la HA, el hueso nuevo se forma en el interior de los poros del material integrándose con el mismo, que apenas sufre reabsorción (295–297).

La arquitectura de las esponjas cerámicas juega un papel fundamental en la migración y supervivencia celular; pues determina si se produce el paso de nutrientes y oxígeno al interior del andamio y la posterior eliminación de los productos de desecho (298).

La porosidad se define como la cuantificación de espacios abiertos entre granos, o en el interior de los mismos, en una microestructura (299). La porosidad total, distribución de poros y tamaño y forma de los mismos influyen en las propiedades mecánicas y biológicas de las esponjas. El aumento de porosidad hace que disminuyan sus propiedades mecánicas y que aumente su degradabilidad. También el aumento del tamaño de poros y de las interconexiones entre los mismos hace que disminuyan las propiedades mecánicas. Al contrario, la distribución monomodal de los poros otorga de mejores propiedades mecánicas a la esponja, al igual que los poros esféricos frente a los alargados (300).

Hench L. estableció en 1991 cuatro tipos de uniones que podían tener lugar entre las biocerámicas y los tejidos (301).

- *Fijación morfológica*: Ésta se produce con materiales densos, no porosos, casi inertes. Tiene lugar una unión al “tejido por cementación”, no hay unión química ni mecánica, es una cápsula fibrosa de grosor variable la que envuelve el material. Se produce tanto en tejidos duros como blandos. Un ejemplo es cuando se emplea Al_2O_3 densa como cristal único o policristalina.

- *Fijación biológica*: Tiene lugar cuando se emplean materiales porosos pero inertes. El crecimiento de hueso se produce a través de los poros del material, estableciendo uniones mecánicas con el mismo. Es la unión que se produce en los recubrimientos de HA y con Al_2O_3 porosa.

- *Fijación bioactiva*: Cuando se produce una unión química entre el hueso y el material. Es la que se da con el empleo de materiales de superficie reactiva que provocan una respuesta específica en la interfase del material, como por

ejemplo los biovidrios, cerámicas con vidrio bioactivo, hidroxiapatita...

- *Reemplazo*: El reemplazo tienen lugar con materiales tanto porosos como no porosos, pero sí reabsorbibles; que se degradan y son sustituidos por el tejido huésped. Se produce cuando se emplean materiales cerámicos como el sulfato cálcico, fosfato cálcico, sales de fosfato cálcico, etc. Es importante que el ratio de reabsorción del material y la velocidad de formación del tejido estén igualados para mantener la fuerza y estabilidad de la interfase.

Los poros, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) se clasifican en: microporos, si su tamaño es menor a 2 nm; mesoporos, si su tamaño oscila entre 2 y 50 nm; y macroporos, cuando su tamaño supera los 50 nm. Pero los científicos en biomateriales emplean el término macroporosidad cuando ésta supera las 50 μm , y microporosidad cuando los poros son inferiores a 50 μm (302).

La **macroporosidad** determina la arquitectura, morfología, interconexión y distribución del tamaño de poros, que están directamente relacionados con la capacidad del material para ser colonizado por células y, en definitiva, con el crecimiento óseo. Para la regeneración ósea, así como la formación de vasos sanguíneos, los diferentes estudios muestran que el tamaño de poros debe ser de entre 100 y 400 μm , y algunos autores determinan que el tamaño óptimo se sitúa entre 300 y 400 μm (303–305). En contraste, algunos resultados mostraron que el tamaño mínimo para que se forme hueso mineralizado sobre el material es de 50 μm , sin necesidad de alcanzar 100 μm (306,307). Si los poros son de diámetro pequeño, la condrogénesis tiene lugar previa a la osteogénesis; en poros de mayor tamaño la osteogénesis se produce directamente, ya que permiten una mejor oxigenación y aporte de nutrientes. El incremento del tamaño de poros reduciría el número de interconexiones, lo que permitiría acelerar la colonización celular, pero a expensas de la reducción de las propiedades mecánicas de la cerámica (294,308).

Kuboki et al. (2001) mostraron que el tamaño de poros de partículas de hidroxapatita ejerce una influencia directa en la angiogénesis y en la formación ósea. Con tamaños de poro de entre 90 y 110 μm , las células mesenquimales forman en primer lugar cartílago que es seguido por la formación de hueso a través de un proceso similar a la formación ósea endocondral, esta osteogénesis tiene lugar por la invasión de los vasos del tejido cartilaginoso (309).

Von Doernberg et al. (2006), compararon cómo se producía la reabsorción del material y la formación de hueso cuando se empleaban cilindros de β -TCP con porosidades de diferentes tamaños (150, 260, 510, y 1220 μm). Los resultados mostraron que las esponjas que tenían macroporos (mayores a 510 μm), sufrían una rápida reabsorción que inducía una formación de hueso más lenta (310).

Klenke et al. (2008) obtuvieron una vascularización más rápida en partículas cerámicas de fosfato cálcico bifásico cuyos poros eran superiores a 140 μm (para tamaños de poro de 140-210 μm del orden de 111 ± 11 horas, y para 210-280 μm del orden de 106 ± 15 horas). Además, en los poros de mayor tamaño hubo una menor presencia de tejido fibroso (311).

Del mismo modo, Tang et al. (2016) observaron una adherencia de células madre de pulpa dental humana más favorable en la superficie de las esponjas que tenían un diámetro de poro de entre 100 y 200 μm (312).

La presencia de macroporos interconectados es un requisito para la osteoinducción de los materiales, pues la angiogénesis es clave para el transporte de nutrientes y oxígeno. Por otra parte, el crecimiento celular se produce desde la superficie del material al interior del mismo. Las células unen los macroporos y se anastomosan entre sí a través de las prolongaciones citoplasmáticas que viajan por las interconexiones. En diversos estudios se ha establecido el tamaño óptimo que deben presentar dichas interconexiones. Según Bignon et al. (2003), el tamaño de las interconexiones efectivo para promover la colonización celular sin que la esponja vea reducida su fuerza mecánica, son 15 μm (313).

Mastrogiacomo et al. (2006) concluyeron que la morfología de las interconexiones de los poros deben ser de un tamaño mayor (100 μm), para permitir la migración celular y una formación de vasos sanguíneos eficiente para nutrir el nuevo hueso formado y el remodelado óseo (314). Para Feng et al. (2011), el tamaño mínimo para que se produzca la formación ósea es de 50 μm (315).

Con respecto a la morfología del poro, a partir de los resultados de diversos estudios, se ha comprobado que, a pesar de que la formación ósea se produce de forma similar en esponjas con poros aleatorizados y poros alineados, se encontraron niveles altos de marcadores osteogénicos en esponjas que poseían poros esféricos situados de manera aleatorizada (316). La geometría de los canales tampoco afecta al porcentaje de nuevo hueso formado, pero sí determina la formación de dicho hueso; se ha observado que la morfología radial induce que el hueso se forme en el centro del implante, mientras que en la morfología ortogonal se observó una mezcla de matriz de hidroxipatita y hueso recién formado (308).

La diferente naturaleza que poseen el hueso y el cartílago hace que se requieran características diferentes de los biomateriales para su regeneración. Los poros en el rango entre 100 y 200 μm son óptimos para la reparación cartilaginosa, y los poros de entre 300 y 400 μm son ideales para la neoformación ósea (316,317).

No se han determinado las propiedades ideales de una esponja para la regeneración ósea, pero algunos estudios in vivo han demostrado que la distribución bimodal con un tamaño de poros intermedio favorece la regeneración ósea. Hing KA (2005) sugiere que la porosidad total que debe contener una estructura es de entre el 50-60%, con un 20% de interconexiones de un tamaño superior a 50-100 μm (318). Posteriormente, y en concordancia con los resultados mencionados, AbdulQader et al. (2105), evaluaron el impacto de la porosidad total de esponjas de fosfato cálcico bifásico (BCP) en la viabilidad celular. Los resultados mostraron que en presencia de porosidades elevadas (75 y 65%), la viabilidad y proliferación de células pulpares humanas se reducía a causa de la liberación de iones calcio y fosfato al medio por

la reabsorción de las esponjas. Con las esponjas con 50% de porosidad, la diferenciación odontoblástica mostró una regeneración favorable del tejido pulpar (319).

Para que se produzca la unión del hueso al biomaterial, no es un requisito que sea un material bioactivo. Lo que se necesita es una topografía altamente compleja, suficientemente estable, en la que la línea cemental pueda realizar sus interdigitaciones y madure sobre dicha superficie. Si el material se reabsorbe muy rápidamente, como ocurre con algunas formas de fosfato tricálcico, la superficie no proporciona la estabilidad suficiente para que tenga la formación de la línea cemental sobre el material (320). Otro requisito para que se produzca la unión de hueso a un material de fosfato cálcico es la necesidad de poros en superficie de al menos 1 μm de diámetro. La **microporosidad** incrementa la adsorción y retención de proteínas y la capacidad de las células para proliferar y diferenciarse. Además, es determinante en la reabsorción del material. Es importante que el porcentaje de microporosidad que presente el material sea el adecuado. Algunos autores mostraron que la presencia de una elevada microporosidad (en torno al 25-30%), disminuye la viabilidad de células del estroma de la médula ósea y la diferenciación osteoblástica junto a un descenso de la fosfatasa alcalina y la secreción osteoclástica. Atribuyen este hecho a que una microporosidad demasiado elevada produzca una solubilidad de la cerámica mucho mayor que eleve la concentración de iones Ca^{2+} y PO_4^{2-} en el entorno, afectando a la viabilidad de los osteoblastos (321,322). Por otro lado, es necesario que se produzca un contacto entre el hueso y el material para que se forme la línea cemental introduciendo sus interdigitaciones en las socavaduras del material, que a su vez deben estar en la escala del rango de micras o nanómetros (34). Lapczynska et al. (2014) no encontraron diferencias en la formación de hueso y en la reabsorción del material transcurridas 2, 4 y 8 semanas desde la implantación de esponjas de β -TCP con un 80% de porosidad y macroporos de 150 μm , pero con porcentajes diferentes de microporos (10% y 25%) (323).

Todavía no se ha determinado cuál es la arquitectura ideal que debe poseer una esponja en lo que a parámetros de microporosidad y macroporosidad se refiere para inducir la formación de hueso de forma más optimizada.

El área superficial ejerce un papel fundamental e imprescindible en la formación ectópica de hueso. Arizumi et al. (2013) han comparado β -TCP de diferentes porosidades y han determinado que la microporosidad juega un papel de importancia a la hora de mejorar las propiedades osteoinductivas de un material. Las posibles causas que se barajan para que se produzca este hecho son que los osteoclastos actúan con mayor rapidez en las zonas con microporosidad y que a este hecho, como es sabido, le sigue la formación ósea. Por otra parte, los microporos son lugares adecuados para que se produzca el depósito de proteínas (fibronectina y vitronectina) y de fibras colágenas, claves para que tenga lugar la neoformación de tejido óseo (324). Lu y Leng (2003) afirmaron que la respuesta fibroblástica tiene lugar con una altura de crestas menor a 2 μm y una separación de las mismas de 10 μm . Si la altura de las crestas es superior a 2 μm y la separación mayor a 10 μm , se produce una respuesta osteoblástica (325).

Klenke et al. (2007) afirman que es necesaria la vascularización para que tenga lugar dicha osteogénesis; por tanto, no es suficiente que el material posea una elevada área de superficie, sino que también son imprescindibles macroporos de un tamaño adecuado (311). Sin embargo, Zhang et al. (2014) observaron que la interconexión de los macroporos no es necesaria para que tenga lugar la osteoinducción; siendo lo más importante la microarquitectura de superficie, pues ésta es capaz de inducir la formación ectópica de hueso (326).

Generalmente se emplean cerámicas de fosfato cálcico que han sido sinterizadas a altas temperaturas, lo que imposibilita conseguir que presenten superficies específicas elevadas, situándose habitualmente en el rango de 0.2-2 m^2/g . Barba et al. (2017), consiguieron obtener piezas de HA calcio deficiente con macroporosidad cóncava y de superficie específica del orden de 38 m^2/g a través de reacciones de autofraguado y sinterizado a bajas temperaturas. De este modo optimizaron la

osteoinducción del material comparándolo con β -TCP y BCP, y con otras arquitecturas con geometría de poro prismática (327). Lee et al. (2015), fabricaron un granulado de β -TCP modificando la reacción de precipitación en húmedo, a través de una mezcla líquido-sólido. De este modo consiguieron un menor tamaño de partícula (395 ± 101.75 nm), lo que se tradujo en una mejora de las propiedades mecánicas y en la respuesta biológica en cuanto a formación de hueso se refiere, al emplear el granulado obtenido con ese polvo, que presentaba una elevada porosidad y superficie específica (75% y 2.5 m²/g respectivamente) (279).

A pesar de lo mencionado con respecto a la porosidad como característica indispensable de un sustituto óseo, apenas existen estudios que evalúen la respuesta del hueso ante un biomaterial totalmente denso y con escasa superficie específica. Kuboki et al. (1998) fue el primero en establecer la necesidad de porosidad. Para ello, implantó portadores de hidroxapatita con diferentes características combinados con BMP vía subcutánea en la espalda de ratas para comprobar la producción de osteogénesis ectópica. Discos de HA con 66% de porosidad y poros de diámetro de 230 micras, granulado de HA de entre 0.3 y 0.5 mm con porosidad del 70% y tamaño de poro de 150 micras y, por último, gránulos de HA no porosos con un tamaño de entre 0.3 y 0.5 mm. Cada uno de estos materiales tenía un control que en lugar de portar BMP portaba colágeno. Encontraron que se producía hueso de forma ectópica a partir de la segunda semana tras su implantación en los portadores porosos que contenían BMP, en los que contenían colágeno solamente había tejido fibroso, sin presencia de hueso ni cartílago. Las partículas sólidas fueron rodeadas con tejido conectivo fibroso, tanto las que portaban BMP como las que no lo hacían (328).

Ghanaati et al. (2010), concluyeron que cambios en la porosidad, tamaño y forma de las partículas (en este caso de β -TCP), pueden inducir cambios en la respuesta de las células gigantes multinucleadas, así como en los niveles de vascularización del lecho implantario. En los implantes que poseían una baja microporosidad (25%, 0.1-50 μ m), la formación de hueso se producía en el exterior de los gránulos

uniéndolos de modo que semejaban estar colocados “en forma de mosaico”. En el interior de los mismos sólo existía tejido conectivo reticular, por lo que no se produce la angiogénesis en su interior (329).

Otros factores de la superficie de los materiales que se han observado son la humedad superficial y la carga de la superficie. En una revisión bibliográfica realizada en el año 2005, concluyeron que las superficies moderadamente hidrofílicas inducen respuestas celulares más favorables para la regeneración ósea que los materiales hidrofóbicos. Con respecto a la carga de superficie, tanto aquellas cargadas positiva como las que lo están negativamente promueven la adhesión de células y sustentan sus funciones. Los dos materiales más estudiados en la osteointegración, el titanio y la hidroxiapatita, presentan una superficie negativa y un comportamiento hidrofílico a pH fisiológico (193).

1.3.6- NORMATIVA SOBRE LA HOMOLOGACIÓN DEL β -FOSFATO TRICÁLCICO Y LA HIDROXIAPATITA COMO SUSTITUTOS ÓSEOS

Para que se produzca el acceso de un producto sanitario (y entre ellos un sustituto óseo) al mercado, es necesario que cumpla con unas normas que, a pesar de ser voluntarias, resultan imprescindibles para que circulen por zonas de libre-cambio.

Los implantes se rigen a nivel europeo por el Reglamento (UE) 2017/745 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios, por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE, el Reglamento (CE) n.º 178/2002 y el Reglamento (CE) n.º 1223/2009 y por el que se derogan las Directivas 90/385/CEE y 93/42/CEE del Consejo. Este Reglamento incide en la necesidad de establecer procesos más rigurosos para la introducción en el mercado y comercialización de los productos; clarifica las obligaciones y responsabilidades de los agentes económicos (fabricantes, representantes autorizados, importadores, distribuidores); impone el

fortalecimiento del seguimiento, vigilancia y control tras la comercialización de los productos; incide en la necesidad del aumento de la transparencia y la trazabilidad de información al alcance de los profesionales, pacientes y público en general; establece el Grupo de Coordinación de Productos Sanitarios para la mejora de la coordinación y cooperación administrativa para alcanzar una aplicación uniforme del reglamento (330).

A nivel estatal, la reglamentación que corresponde es el Real Decreto 1616/2009, de 26 de octubre, que regula los productos sanitarios implantables activos (331).

Los fabricantes pueden optar por cualquiera de los procedimientos de certificación que la Directiva haya establecido para cada clase de producto. Los organismos que los gobiernos habilitan para notificar a la Comisión Europea que el producto cumple con los requisitos establecidos o si ha de ser objeto de investigaciones clínicas y el diseño de las mismas, se denominan Organismos Notificados. Estos pueden ser entidades públicas o privadas. En España la Dirección General de Farmacia y Productos sanitarios actúa como organismo Notificado y como Autoridad Sanitaria competente de control. La superación de este proceso reglamentario le otorga al producto el marcado CE, que acredita la presunción de conformidad con los requisitos esenciales establecidos en la Directiva, asegurando la libre circulación del producto en la Unión Europea. El marcado CE se basa en el cumplimiento de requisitos esenciales como la seguridad, funcionalidad y efectividad.

A nivel internacional, la normativa ISO que rige los requisitos de los polvos de hidroxiapatita como materia prima para fabricación de implantes y recubrimiento de implantes es la normativa ISO 13779-6:2015 (332). La normativa ISO 13175-3/2012, especifica los requisitos para los sustitutos óseos de hidroxiapatita monofásica, fosfato tricálcico monofásico y de compuestos bifásicos hidroxiapatita/fosfato tricálcico en forma de bloques o gránulos (333).

Según las normas estadounidenses A.S.T.M. F 1085-88 y A.S.T.M. 1088-87 los sustitutos basados en HA y β -TCP deben contener en su composición, al menos el 95% de las sustancias principales, HA y β -TCP respectivamente.



1.4- OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral es el siguiente: Se pretende *estudiar el efecto de la composición, de la microestructura interna y de la topografía superficial de los implantes biocerámicos a nivel de micro y meso escala (1-100 micras), en la biocompatibilidad y bioactividad de las biocerámicas de fosfato*, para su uso como implantes en cirugía ortopédica, neurocirugía, cirugía estética y reparadora, odontología y otras.

Para lograr este objetivo general, es necesario alcanzar previamente los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar los biomateriales comerciales de hidroxiapatita (Deproteinized Bovine Bone, Bio-Oss) y β -fosfato tricálcico (KeraOs) previos a su implantación.
- Realizar síntesis de biocerámicas de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico de elevada pureza.
- Conformar implantes densos de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico con una densidad superior al 97%.
- Conformar implantes micro y macroporosos de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico con una interconectividad controlada e igualada.
- Preparar los implantes densos y de porosidad controlada para la implantación de los mismos en pequeños animales.
- Implantar los injertos biocerámicos anteriormente mencionados en conejos New Zealand.
- Preparar láminas delgadas a través del procedimiento específico para tejidos duros.
- Evaluar las zonas injertadas mediante métodos histomorfométricos y radiológicos.





MATERIAL Y MÉTODOS



2- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1- MATERIALES

2.1.1- CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES COMERCIALES

Los biomateriales sintéticos comerciales que se han empleado en el presente trabajo de investigación son: KeraOs® (Keramit S.L., España), cuya composición química es β -fosfato tricálcico de elevada pureza; y Bio-Oss® (Geistlich, Switzerland), que se trata de hueso bovino desproteínizado, cuya composición química es fundamentalmente hidroxiapatita.

2.1.1.1- Hidroxiapatita (Bio-Oss®)

Bio-Oss® (Geistlich, Switzerland) es uno de los biomateriales más empleados para la cirugía regenerativa del tejido óseo en todo el mundo. Se trata de un xenoinjerto que consta de una matriz mineral natural de hueso bovino a la que se le han eliminado todos los componentes orgánicos. Gracias a su estructura natural, es física y químicamente comparable a la matriz mineralizada de hueso humano. Su “nanotextura” superficial favorece su colonización por proteínas. Este sustituto óseo carece de capacidad osteoinductora, su función en la regeneración ósea es fundamentalmente osteoconductora, sirviendo como andamiaje para las células osteoprogenitoras gracias a su arquitectura de poros interconectados. Su permanencia a largo plazo en el tejido óseo huésped hace que algunos autores le atribuyan cierta desventaja porque podría restringir la formación de nuevo hueso y su posterior remodelación; sin embargo, en situaciones en las que se necesite preservación del volumen óseo su presencia podría resultar ventajosa ya que condiciona la remodelación ósea (282).

En un estudio reciente se han evaluado las propiedades físicoquímicas, viscoelásticas e hidrofílicas de diferentes sustitutos

óseos dentales, entre ellos Bio-Oss®. En el mismo, se determinó que presenta un grado de hidrofiliicidad bajo. El difractograma mostró picos anchos a causa de la menor cristalinidad de este material y se observó también la presencia de agua químicamente ligada y dióxido de carbono(334).

2.1.1.1.1- Difracción de Rayos X

En el difractograma (Fig. 2.1) obtenido del estudio con difracción de rayos X a una muestra de Bio-Oss®, se observan los picos característicos del fosfato cálcico hidroxiapatita en una fase amorfa (ficha JCPDS N° 89.6437 según las bases de datos del ICDD), dato que concuerda con los resultados obtenidos por Trajkovski et al. (2018) anteriormente mencionados (334). Esto es debido al tratamiento de desproteinización al que el hueso bovino es sometido para poder ser empleado como xenoinjerto. El hueso se somete a altas temperaturas durante varias horas, se sumerge en soluciones alcalinas para su limpieza y se procede a su esterilización previo embalaje.

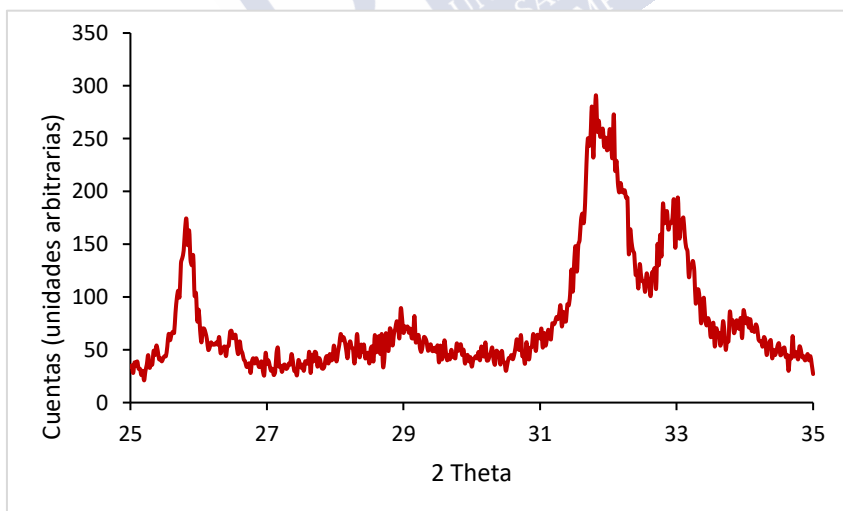


Fig. 2.1: Gráfica en la que se muestra el resultado del estudio de difracción de rayos X al material Bio-Oss®.

2.1.1.1.2- Superficie específica y Porosimetría

Bio-Oss® posee una elevada superficie específica, $84.53 \pm 4.00 \text{ m}^2/\text{g}$, imposible de alcanzar con materiales sintéticos. Este valor se atribuye a la microarquitectura de tejido óseo que posee. Su porosidad, que representa un total del $55.6\% \pm 0.4$ del volumen, presenta una distribución bimodal como se puede observar en la Fig. 2.2. En la Fig. 3.3 se observa como la microporosidad constituida por poros de entre 0.1 y $0.01 \text{ }\mu\text{m}$, de tamaño inferior a la porosidad que presenta KeraOs®, representa la mayor parte de la porosidad total del material. Esta se asocia a los conductos de Havers que actúan de conductores de vasos y nervios y a las lagunas que contienen los osteocitos en el hueso. La macroporosidad reflejada por los poros de entre 150 y $50 \text{ }\mu\text{m}$ constituye un porcentaje inferior. Esta se debe a los espacios trabeculares y a los espacios remanentes entre granos.

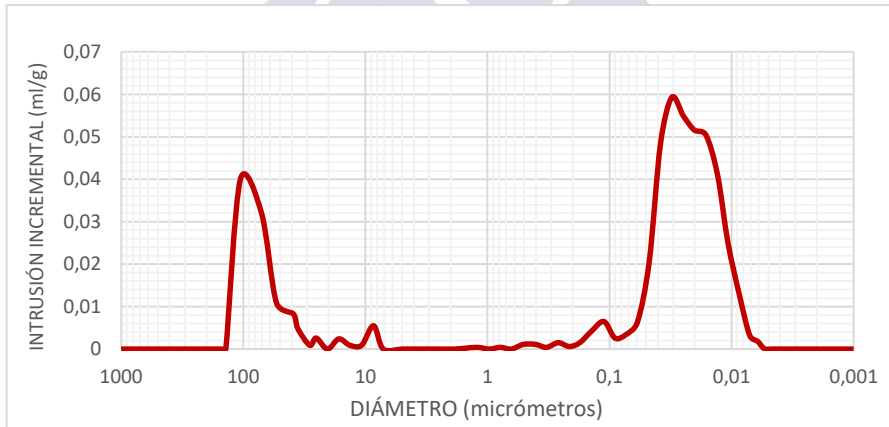


Fig. 2.2: Curva de distribución del volumen poroso del material Bio-Oss®, en la que se observa una distribución bimodal.

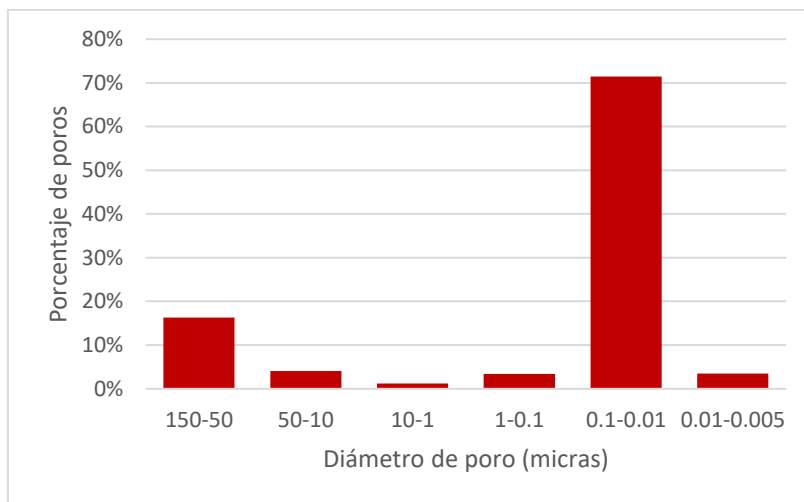


Fig. 2.3: Histograma en el que se representa la distribución de poros de Bio-Oss®. Como se puede observar, el mayor porcentaje de poros se encuentra entre 0.1 y 0.01 μm (71.5%); seguido por los poros de mayor tamaño (entre 150 y 50 μm), que representan el 16.3%. Los poros de entre 50 y 0.1 μm corresponden al 8.7% del total, y los poros menores de 0.01 μm son el 3.5%.

2.1.1.1.3- Microscopía

En las siguientes imágenes, obtenidas con microscopía óptica estereoscópica y con microscopía electrónica de barrido, se observa el granulado de Bio-Oss®. En las primeras (Fig. 2.4.a y Fig. 2.4.b), se puede advertir la macroporosidad debida a su estructura trabecular, además del tamaño de sus partículas, que según el fabricante está comprendido entre 0.25 y 1 mm. En la Fig. 2.4.c se observa la microestructura de superficie y microporosidad.

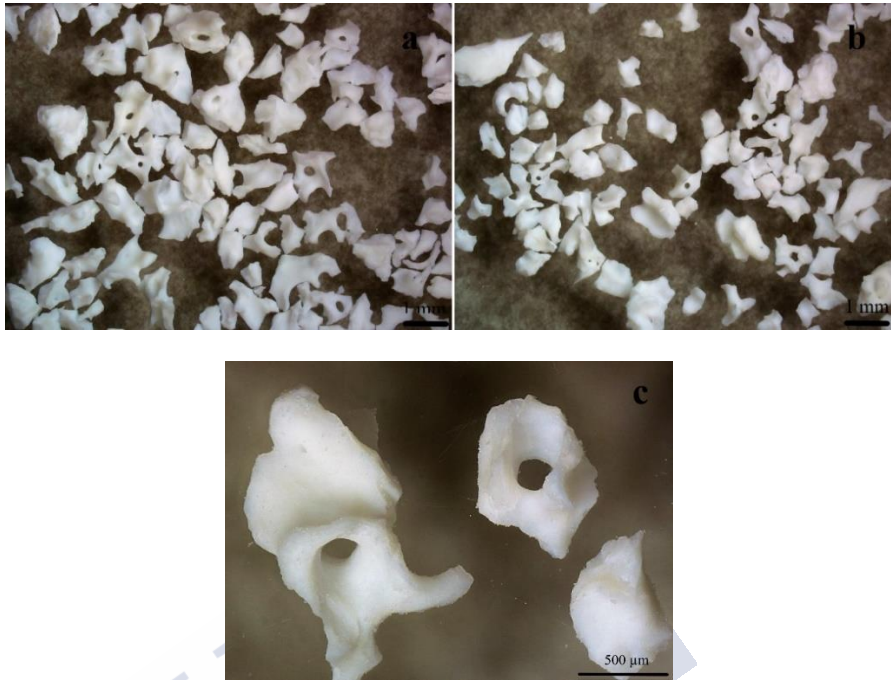


Fig. 2.4: En ellas se observa, (a) y (b): el granulado de Bio-Oss®. (c): algunos granos seleccionados a mayor aumento. Se puede apreciar la presencia de partículas que en su longitud mayor superan el tamaño de 1 mm, pero no partículas inferiores a 0.25 mm.

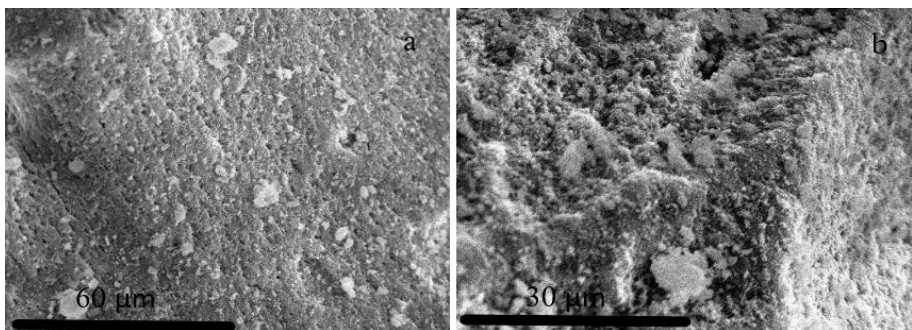


Fig. 2.5: En la imagen (a) se aprecia la microporosidad y en la imagen (b) la rugosidad de superficie, la cual le otorga su elevada superficie específica. Ambas características se mencionaron en el apartado 2.1.1.1.2.

2.1.1.2- β -Fosfato tricálcico (KeraOs®)

KeraOs® (Kerammat S.L., España), es un material sintético compuesto por β -fosfato tricálcico de una pureza superior al 99%. Este material se disuelve cuando es introducido en un medio fisiológico, y su precipitación induce la formación de hueso, ya que su tasa de reabsorción tiene lugar a la velocidad adecuada para tal fin. Entre las indicaciones de KeraOs® figuran: rellenos de cavidades óseas postextracción, reconstrucciones crestales, recubrimiento de fenestraciones, defectos intraóseos en periodoncia, regeneración ósea en expansión, lesiones furcales, exposiciones radiculares, etc.

Para su utilización, se recomienda mezclar el granulado antes de ser empleado con suero fisiológico o sangre del paciente, pues su naturaleza hidrofílica hace que los gránulos se aglomeren facilitando su manipulación y evitando que se dispersen en la zona receptora.

Es necesario recordar que no posee elevadas propiedades mecánicas por lo que no se recomienda someter a cargas la zona injertada hasta que haya transcurrido el tiempo necesario.

2.1.1.2.1- Difracción de Rayos X

Mediante la realización del estudio de difracción de rayos X al material comercial KeraOs®, se ha obtenido el siguiente difractograma (Fig. 2.6) en el que se observan los picos característicos para β -fosfato tricálcico (ficha JCPDS N° 09-0169 según las bases de datos del International Center for Diffraction Data -ICDD-). Se ha comprobado que la pureza es superior al 99% midiendo el área del pico presente a 31.038° , sin presencia de fases secundarias como hidroxiapatita (pico a 31.8°) o C_2P (pico a 28.8°). Los picos muestran una elevada cristalización del material debido al tratamiento térmico de sinterización.

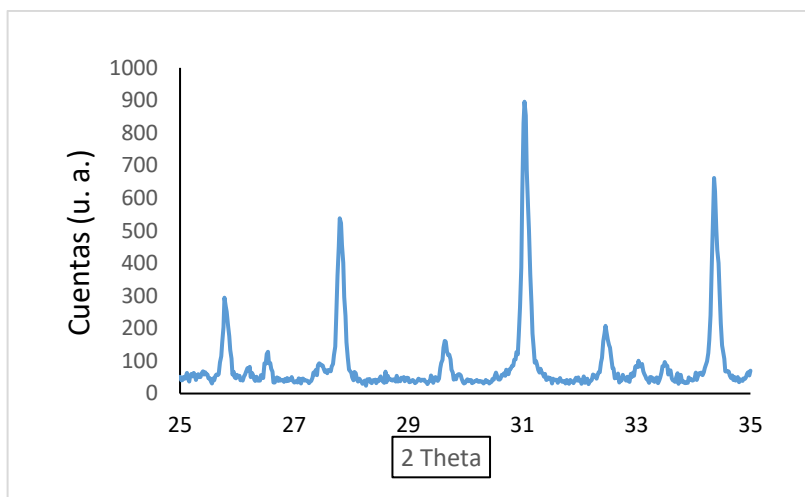


Fig. 2.6: Difractograma del material comercial KeraOs®.

2.1.1.2.2- Superficie específica y Porosimetría

KeraOs® posee un área de superficie de 0.28 ± 0.03 m²/g. Su porosidad es del $21.2 \pm 1.9\%$, con una distribución prácticamente monomodal, como se puede observar en la Fig. 2.7, con todos los poros concentrados en el rango entre 1 y 0.5 μ m. A su vez, en la Fig. 2.8 se observa cómo la microporosidad constituida por poros de entre 1 y 0.1 μ m, representa la mayor fracción. No hay macroporosidad presente en este material.

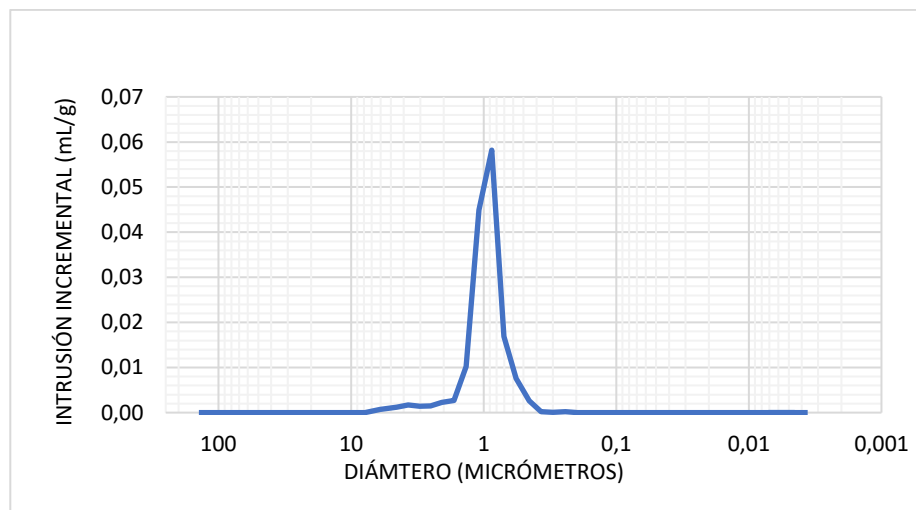


Fig. 2.7: Curva de distribución del volumen de poros de KeraOs®.

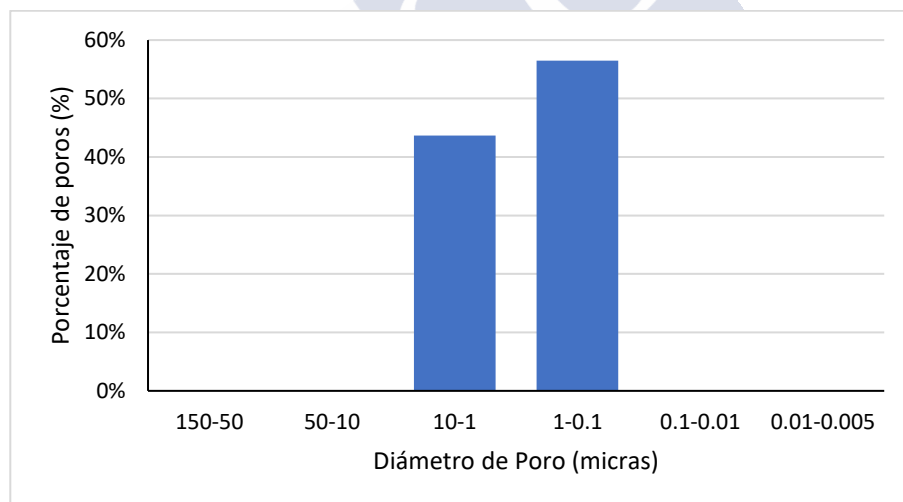


Fig. 2.8: Histograma en el que se representa la distribución de poros de KeraOs® por tramos. La porosidad comprendida entre 150 y 10 μm es inexistente, la microporosidad entre 10 y 1 μm representa un 44.7% del total de los poros. Los poros comprendidos entre 1 y 0.1 μm son la mayor fracción, representando el 56.5% del total de la porosidad. Tampoco hay presencia de poros menores a 0.1 μm .

2.1.1.2.3- Microscopía

En las siguientes imágenes de microscopía óptica estereoscópica y microscopía electrónica de barrido, se aprecia el granulado de KeraOs®. En las imágenes de la Fig. 2.9 se observa el tamaño del granulado, entre 0.25 y 1 mm, así como la estructura de las partículas a mayor aumento. En la Fig. 2.10 se observa la microestructura de superficie y microporosidad.

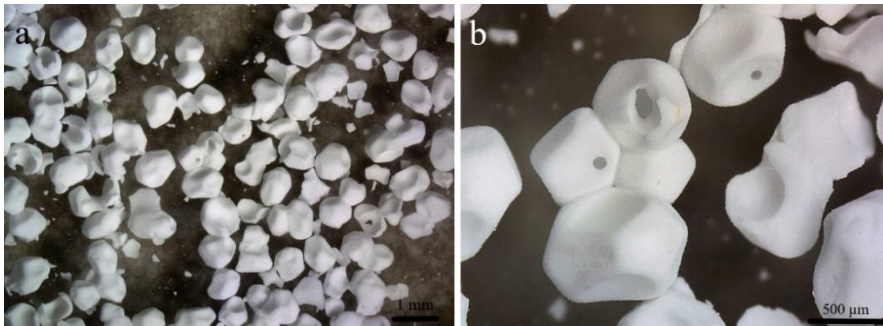


Fig. 2.9: Fotografías que muestran el granulado de KeraOs® a diferentes magnificaciones. En la imagen (a) se aprecian los poros presentes en los granos, correspondientes a la porosidad de mayor tamaño que se muestran en la curva de porosidad, y las concavidades y convexidades que contienen las partículas que, al ser empaquetadas en el defecto óseo, dejan cavidades remanentes para que se produzca el crecimiento del tejido dentro de las mismas.

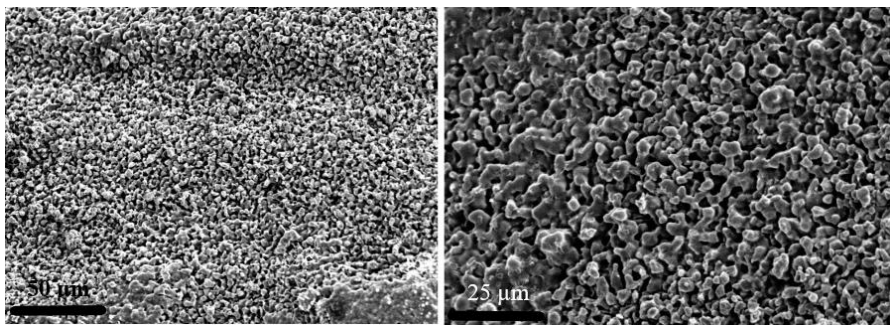


Fig. 2.10: Imágenes en las que se muestra la microtopografía de superficie de KeraOs®, y que se corresponde a la microporosidad comprendida entre 1 y 0.1 µm, debida fundamentalmente al sinterizado del material.

2.1.2- SÍNTESIS DE LOS POLVOS DE HIDROXIAPATITA Y β -FOSFATO TRICÁLCICO DE ELEVADA PUREZA

Para realizar la síntesis, tanto de hidroxiapatita como de β -fosfato tricálcico se han empleado los reactivos con las características que se muestran en la Tabla 2.1:

Tabla 2.1: Reactivos utilizados en las síntesis de Hidroxiapatita y β -TCP

NOMBRE	MARCA	FÓRMULA	PUREZA	DENSIDAD (g/cm ³)
Nitrato cálcico tetrahidratado	Panreac	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	99%	1.86
Ácido ortofosfórico	Panreac	H ₃ PO ₄	85%	1.70
Amoniac	Panreac	NH ₃	33%	0.89 (20°)

2.1.2.1- Hidroxiapatita

Para la obtención de hidroxiapatita de elevada pureza ($\geq 99\%$), se ha seguido el método puesto a punto en la tesis doctoral de Santos, C. (1995), realizada en el Instituto de Cerámica de Galicia (3).

La síntesis de hidroxiapatita se realizó por vía húmeda y los mismos parámetros que han sido controlados para realizar la síntesis de β -TCP, se han controlado durante la síntesis de HA, con los valores que se indican en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Valores de los parámetros tenidos en cuenta durante la síntesis de HA.

pH disol. Ca(NO₃)₂	pH disol. H₃PO₄	Vel. adición (ml/min)	Tiempo envejeci- miento (h)	Ca/P	[Ca(NO₃)₂]	[H₃PO₄]
11	11	> 30	72	1.67	0.431 M	0.258 M

Se preparan igualmente una disolución acuosa de nitrato cálcico Ca(NO₃)₂, en esta ocasión 0.431 M, y otra de ácido fosfórico H₃PO₄ 0.258 M, de modo que la relación Ca/P entre ambas sea de 1.67, tal y como se indica en la Tabla 2.2. Antes de proceder a su mezcla, es necesario que ambas disoluciones tengan un pH superior que para la síntesis de β -TCP, que se encuentra entre 10.5 y 11 a una temperatura ambiente aproximada de 25 °C, para ello se basifican añadiendo NH₃ gradualmente mientras se comprueba con el peachímetro el valor hasta que se mantiene estable en ambas disoluciones.

Una vez estabilizado el pH de ambas disoluciones en un valor próximo a 11, se mezclan añadiendo lentamente (“gota a gota”) la disolución de H₃PO₄ a la de Ca(NO₃)₂, a una velocidad de 30-60 ml/min ayudándose de un agitador mecánico. Se mantiene la agitación de la mezcla durante 6 horas, y a continuación se deja la mezcla en reposo durante un tiempo de envejecimiento de 72 horas. Según indica Santos C. (1995), a partir de 72 horas se forma HA pura, siendo más importante el valor de este parámetro que el tiempo de agitación. Transcurrido dicho tiempo, se filtra y se lava el gel obtenido con agua destilada antes de proceder a su secado, inicialmente a temperatura ambiente y a continuación en diferentes estufas, de igual modo que se procedió con el β -TCP (3).

Para obtener HA cristalina hay que someter el gel amorfo obtenido tras el filtrado y secado a temperaturas que oscilan entre 700 y 1050 °C (335). El estudio del tratamiento térmico realizado para obtener los granulados denso y poroso de HA, se explicarán en el siguiente apartado de resultados.

A continuación, en la Fig. 2.11, se observa un diagrama de flujo que representa el proceso llevado a cabo para la síntesis de hidroxiapatita con una pureza superior al 95%.

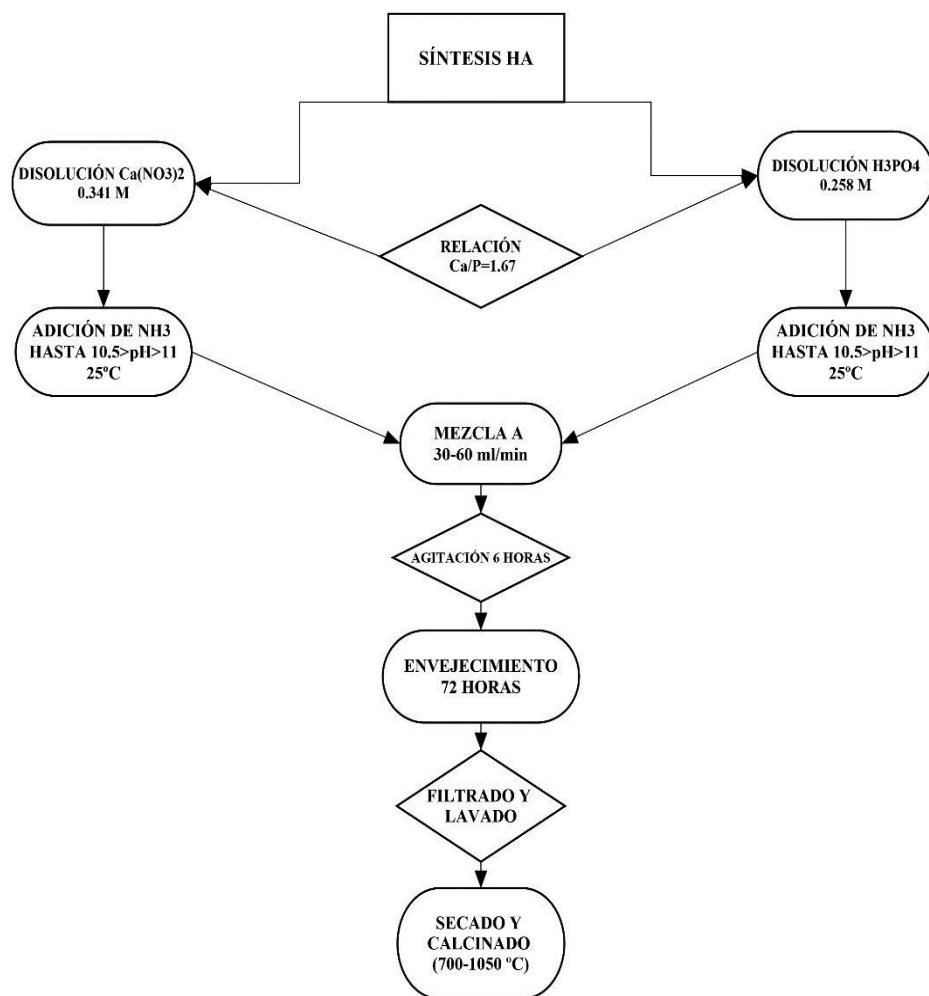


Fig. 2.11: Diagrama de flujo que muestra los pasos llevados a cabo durante el procedimiento para la obtención de hidroxiapatita de elevada pureza.

2.1.2.2- β -fosfato tricálcico

Según indica la norma A.S.T.M. F 1088-87 para su uso como biomaterial, se considera puro aquel β -TCP, que presenta en el análisis por difracción de rayos X de su polvo cristalino una pureza por encima del 95%, es decir, que no presenta una fase secundaria de otro fosfato cálcico en una proporción superior al 5%.

La síntesis de β -TCP de elevada pureza, se puede realizar por vía seca o vía húmeda. La primera consiste en la mezcla de sales de calcio y fosfatos de tal manera que la relación Ca/P final sea de 1,5, y los aniones y cationes se eliminan en fase gas. La segunda vía se realiza de modo indirecto, es decir, el β -TCP se obtiene en fase acuosa para ser sometido después a un tratamiento térmico y obtener así dicho polvo de β -TCP de elevada pureza.

Como se ha mencionado en la introducción, en la presente tesis se ha empleado un método vía húmeda puesta a punto en una tesis doctoral realizada por J. Franco (2004) en el Instituto de Cerámica de Galicia, que permite obtener grandes cantidades de β -TCP con una pureza superior a la exigida por la norma (336).

Este método ofrece un rendimiento elevado con un coste razonable, pero pueden aparecer alteraciones en la estequiometría del producto resultante o presencia de impurezas si se produce una reacción incompleta y hay precipitación (337).

Los parámetros de esta operación son:

- a. pH del medio.
- b. Velocidad de adición.
- c. Tiempo de envejecimiento.
- d. Relación Ca/P de los reactivos.

Tabla 2.3: Tabla en la que se muestran los valores de los parámetros que necesitan ser controlados para la síntesis de β -TCP sintético.

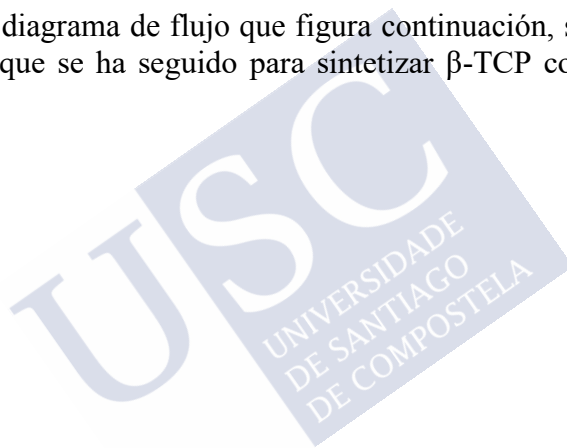
pH disol. Ca(NO ₃) ₂	pH disol. H ₃ PO ₄	Vel. adic. (l/min)	Tiempo envej. (min)	Ca/P	[Ca(NO ₃) ₂]	[H ₃ PO ₄]
10-10.5	10-10.5	30	1	1.5	1.1 M	0.73 M

En primer lugar, se preparan una disolución acuosa de nitrato cálcico Ca(NO₃)₂ 1.1 M, y otra de ácido fosfórico H₃PO₄ 0.73 M, de modo que la relación Ca/P entre ambas sea de 1.5, tal y como se indica en la Tabla 2.3. Antes de proceder a su mezcla, es necesario que ambas disoluciones tengan un pH que se encuentre entre 10 y 10.4 a una temperatura ambiente aproximada de 25 °C. Para ello se le añade NH₃ de forma gradual y se comprueba con el peachímetro el valor hasta que se mantiene estable en ambas disoluciones. El pH es un factor fundamental en la prevención de aparición de fases secundarias como HA y C₂P. Si este se encuentra por debajo de los valores indicados, suele presentarse C₂P en una proporción variable entre el 1 y 6% para velocidades de adición elevadas. En cambio, si es superior a 10.5, puede aparecer como fase secundaria HA.

Una vez estabilizado el pH de ambas disoluciones, se mezclan rápidamente ayudándose de un agitador mecánico y se procede a su filtrado, por ello se indica que el tiempo de envejecimiento es de 1 minuto. Posteriormente se lava con agua destilada para eliminar los excesos de amoníaco. Finalmente se seca a 100°C durante varios días hasta eliminar toda el agua. La velocidad de adición y el tiempo de envejecimiento también son factores decisivos en la aparición de fases secundarias, aunque en menor medida que el pH. Si esta es demasiado lenta, puede favorecer la aparición de HA, mientras que velocidades mayores pueden dar lugar a la formación de C₂P. Lo ideal para obtener β -TCP de elevada pureza es incrementar la velocidad de la mezcla y reducir el tiempo de envejecimiento en lo posible. De este modo se evita la aparición de HA como fase secundaria.

Siguiendo el procedimiento mencionado se obtiene un precursor amorfo (fosfato cálcico amorfo, ACP) que, como ya se ha indicado, es necesario someter a temperatura para obtener β -TCP. Esta transformación de amorfo a β -TCP se produce entre 600 y 700 °C, siendo imposible determinar la temperatura específica. Tanto para obtener las piezas densas como porosas, fue necesario someter el gel seco a diferentes temperaturas de calcinado, con el fin de variar sus características de microarquitectura. Estos procedimientos se detallarán con posteridad en el apartado de resultados de obtención de los granulados denso y poroso.

En el diagrama de flujo que figura continuación, se esquematizan los pasos que se ha seguido para sintetizar β -TCP con una pureza $\geq 95\%$.



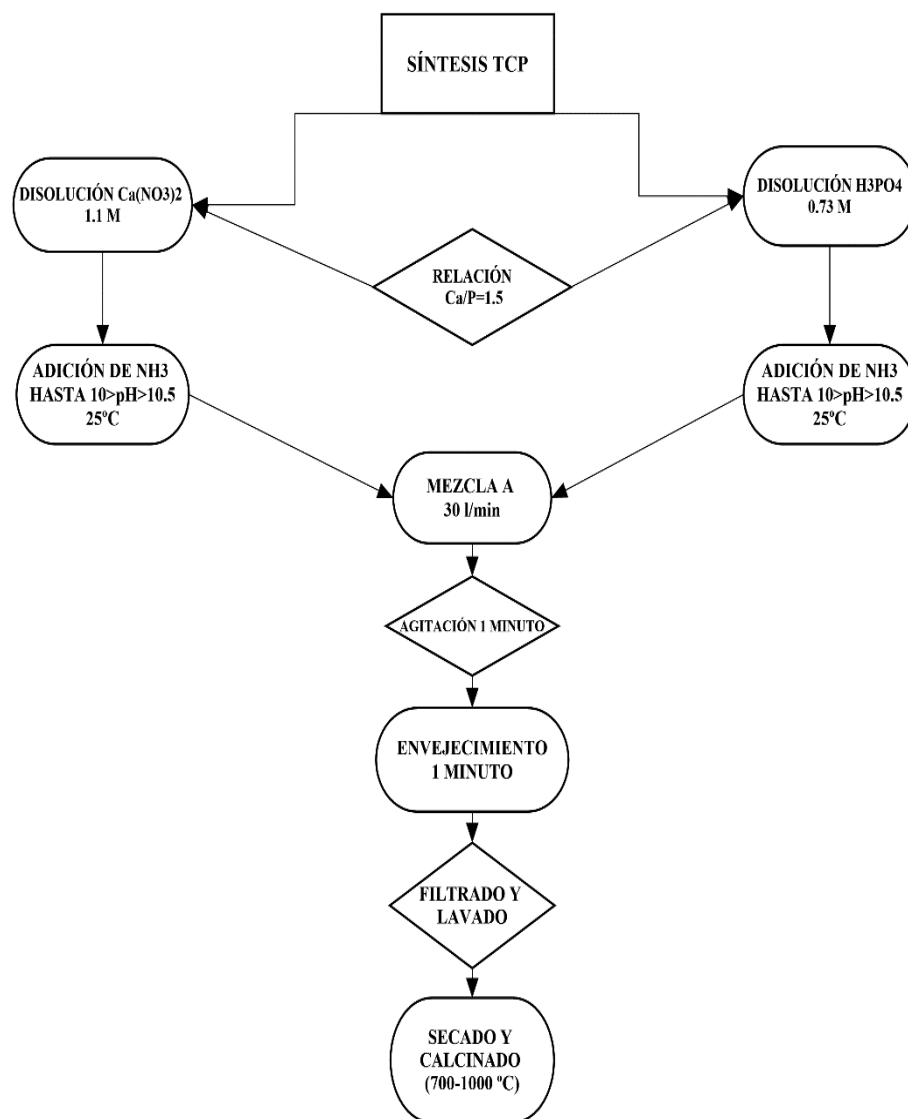


Fig. 2.12: Diagrama de flujo en el que se esquematizan los pasos a seguir para llevar a cabo la síntesis de β -fosfato tricálcico.

2.2- MÉTODOS

En la presente tesis doctoral se han empleado diferentes técnicas analíticas para la caracterización de los materiales comerciales (Bio-Oss® y KeraOs®) y de los sustitutos óseos sintéticos que se han sintetizado con diferente porosidad y arquitectura de superficie; así como diferentes métodos de procesamiento para la síntesis de los segundos. También se han establecido protocolos de implantación de dichos materiales en pequeños animales (conejos New Zealand) y para la realización de los estudios histológico e histomorfométrico a partir de láminas delgadas.

2.2.1- TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.2.1.1- Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X es una de las técnicas más empleadas en el estudio de la materia sólida, a pesar de su metodología veterana, aunque no exenta de renovaciones. Sus orígenes se remontan a principios del siglo XX, cuando Laue (1912) y W.H. Bragg y W.L. Bragg (1915), diseñaron experiencias de difracción y reflexión de rayos X para materiales monocristalinos, lo que les permitió demostrar la naturaleza electromagnética de esta radiación.

En la presente tesis doctoral se ha empleado el método de difracción de polvo, método desarrollado por Debye P. y Scherrer P. en el año 1916 (338), que permite realizar el análisis cualitativo y semicuantitativo de fases cristalinas presentes en una mezcla. Para ello se emplea la metodología “Hanawalt”, en la que cada patrón de difracción aparece caracterizado por los picos de difracción más intensos que se presentan como una “huella dactilar” de su fase cristalina. El difractograma se conforma a partir de análisis matemáticos que realiza el propio equipo en base a los espectros de difracción del patrón que posee el mismo en su base de datos.

Cuando se expone un material bajo la acción de un haz de rayos-X dependiendo de cómo se encuentren dispuestos los átomos que forman el material se podrá observar alguno de los fenómenos siguientes:

- Si se trata de un material amorfo el haz de rayos-X podrá ser reflejado, transmitido o desviado de un modo totalmente aleatorio, puesto que los átomos que forman parte del material no guardan ningún tipo de orden.
- Si el material posee una estructura ordenada, parte de los rayos-X, además de verse transmitidos o reflejados, pueden sufrir un fenómeno de difracción como consecuencia de dicha organización. Una red cristalina es una distribución tridimensional de átomos en un espacio ordenados de tal manera que forman una serie de planos paralelos separados entre sí por una distancia (d), que varía en función de la naturaleza del material. Cuando se realiza un análisis de DRX, un haz monocromado de rayos X incide sobre la muestra de modo que excita a los electrones de los átomos del material provocando su oscilación. Esta oscilación es diferente según el plano en que se encuentren los electrones, pues los de las capas más internas son excitados una fracción de tiempo más posterior que los que se encuentran en las capas superficiales. Si esta diferencia de fase coincide con el valor de la longitud de onda de la radiación o un múltiplo entero de ese valor, los picos de intensidad dispersada siguen las siguientes condiciones, que vienen determinadas por la Ley de Bragg (339) y que se muestran en la siguiente ecuación (Eq. 2.1):

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta \quad [\text{Eq. 2.1}]$$

n : Es un número entero.

λ : Es la longitud de onda de los rayos X.

d_{hkl} : Es la distancia entre planos de la red cristalina

θ : Es el ángulo formado entre el rayo incidente, la familia de planos y el rayo difractado.

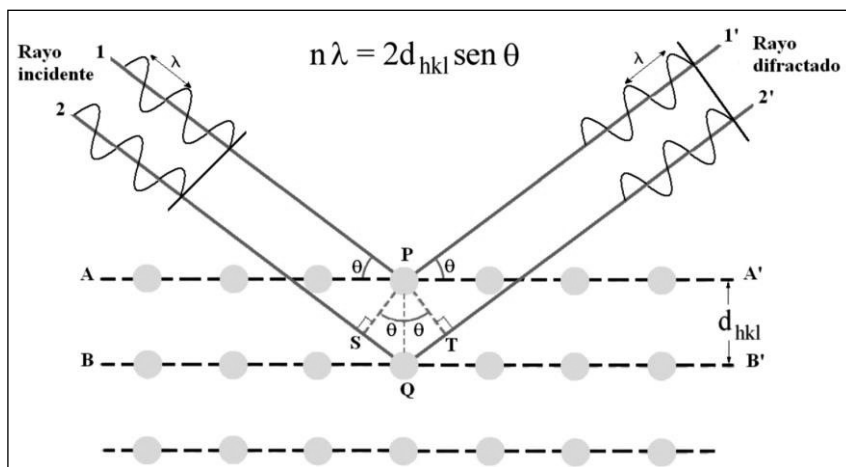


Fig. 2.13. La Ley de Bragg relaciona la longitud de onda de los rayos-X y la distancia interatómica con el ángulo de incidencia del haz difractado. $n\lambda$: son múltiplos de la longitud de onda del haz incidente, d_{hkl} : es el espaciado de la familia de planos, θ : es el ángulo formado entre el rayo incidente y el plano.

En la presente tesis doctoral se ha utilizado un difractómetro Siemens modelo D-5000 (Fig. 2.14), con el generador operando a 40 kV y 30 mA para determinar cuantitativamente las fases presentes en las síntesis de HA y β -TCP, comprobando así su pureza y la no presencia de fases secundarias (como por ejemplo α -TCP) tras el sinterizado de las piezas conformadas. En este equipo los rayos X son generados por un tubo sellado de cobre y la radiación es monocromatizada con un monocromador de grafito ($\lambda(K\alpha_1)=1.5406 \text{ \AA}$). El estudio semicuantitativo de las fases se ha realizado con el software asociado al difractómetro (EVA, Application 7, 0, 0, 1 SOCRIM Copyright © 1996-2001), para determinar los picos característicos de β -TCP (31.038°), HA (31.8°) y C₂P (28.8°), los más importantes para el presente trabajo. Se ha empleado un programa de difracción predeterminado válido para medir HA y TCP, que realiza un barrido variando el 2θ entre 25° y 35° , con un paso barrido de 0.020° , un tiempo de permanencia por paso de 3 segundos y una duración total de 33 minutos y 24 segundos.

La preparación de las muestras para su estudio mediante difracción de rayos X es sencilla. Consiste en moler una porción del material a analizar en un mortero de ágata hasta que el contenido sea tamizado por un tamiz con una luz de malla de 63 μm . Este fino polvo se coloca en un portamuestras.



Fig. 2.14: Difractómetro Siemens modelo D-5000 empleado en el presente trabajo de investigación.

2.2.1.2- Medida de pH

La medida de pH se realizó durante la síntesis de HA y β -TCP para el control del pH de las disoluciones empleadas en los parámetros

necesarios. El pH-metro empleado fue de la marca CRISON®, el modelo GLP 21, con un electrodo 50-14 de la misma marca (Fig. 2.15). El electrolito que se utilizó fue de la marca CRISOLYT®, y las disoluciones tampón también de la marca CRISON®, las cuales son preparadas según la norma DIN 19267.

Su funcionamiento está basado en el hecho de que los iones hidrógeno en disolución, como otras especies iónicas, conducen la corriente eléctrica. Si tenemos una membrana delgada de vidrio que separa dos disoluciones de diferente concentración de ion hidrógeno, se establecerá a través de la membrana de vidrio una diferencia de potencial. El pH-metro mide esa diferencia de potencial, y a través de su calibración interna la convierte en una lectura de pH. En este trabajo, fue necesario calibrar el electrodo para pH básicos; para ello se emplearon disoluciones patrón con un pH de 7 y 9.



Fig. 2.15: Peachímetro modelo GLP 21 de la marca CRISON®.

2.2.1.3- Clasificación granulométrica vía húmeda

Para la determinación del tamaño de partícula de los polvos de las síntesis de HA y β -TCP, se ha empleado el equipo Micromeritics

Sedigraph®5100. Para dicho fin, este equipo utiliza la técnica de sedimentación basándose en la ley de Stokes (340) (Eq. 2.2). Esta técnica, reproducible y precisa a pesar de su simplicidad, mide las velocidades de sedimentación de partículas con diferentes tamaños inducidas por la gravedad y que se encuentran suspendidas en un líquido con propiedades conocidas. Esta ley señala que el tiempo requerido (t) por una partícula de diámetro (d) para sedimentar a una distancia (h) bajando a una velocidad (v), depende de la densidad de la partícula (ρ_s), la densidad del líquido (ρ_l) y la viscosidad del líquido (η):

$$v = \sqrt{\frac{4D \cdot (\rho_s - \rho)}{6\rho} \cdot \frac{1}{\phi Re}}$$

[Eq. 2.2: Fórmula de Stokes]

v= velocidad de caída

D= diámetro esférico equivalente

ρ_s = densidad del sólido en suspensión

ρ = densidad del fluido

$\phi(Re)$ = función del número de Reynolds

Por tanto, las partículas de mayor tamaño caen más rápidamente que las de menor, hasta que finalmente decantan todas ellas en el fondo, quedando el medio sin partículas en suspensión. Dado que generalmente las partículas no tienen una forma regular, el tamaño de las mismas es representado por el diámetro que tendría una esfera del mismo material con la misma velocidad gravitacional (“diámetro esférico equivalente”), es decir, el diámetro que tendría una esfera del mismo material con la misma velocidad gravitacional.

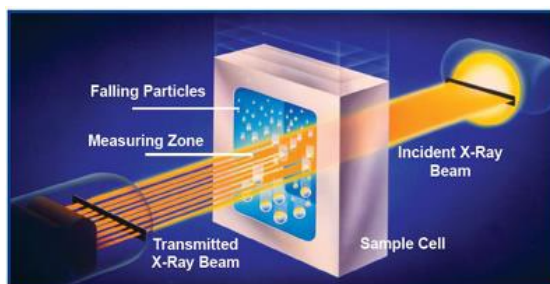


Fig. 2.16: Esquema en el que se representa el funcionamiento de Sedigraph®. Se observa el haz de rayos X que incide sobre la muestra que se encuentra en la celda y el detector. (Reproducida con permiso de Micromeritics Instrument Corp.).

Antes de llevar a cabo el análisis, es necesario realizar una suspensión con muy baja proporción de sólidos en líquido (en este caso se emplearon 3 g de material y 75 ml de agua destilada, a lo que se añadió una gota de dispersante Reotán L). La suspensión se introduce en la cubeta del equipo y, mediante una bomba peristáltica es transportada a la celda de medida. Un rayo colimado de rayos X de baja energía atraviesa la ventana transparente. La celda, desciende con una velocidad proporcional a la densidad del material y a la densidad del medio. La distribución de las partículas en las diferentes zonas de la celda afecta al número de pulsos de Rayos-X que llegan al receptor, que lo hacen de manera proporcional a la densidad del medio, a la densidad del material y al diámetro esférico equivalente. Este número de cuentas es empleado para calcular la distribución y el porcentaje del diámetro de las diferentes partículas que se encuentran en la suspensión.

En la presente tesis doctoral este método se ha empleado para determinar la distribución del diámetro de las partículas de los polvos obtenidos de β -TCP y HA calcinados a diferentes temperaturas.



Fig. 2.17: Equipo Micromeritics Sedigraph® empleado para la clasificación granulométrica vía húmeda de los distintos polvos de HA y β -TCP sintetizados en la presente tesis doctoral.

2.2.1.4- Medición de la Densidad Real

Para medir la densidad real de los polvos obtenidos en las síntesis de HA y β -TCP, y también para comprobar la densidad aparente de las piezas y granulado densos, se empleó un picnómetro de helio Micromeritics Accupyc 1330®, cuyo funcionamiento se basa simplemente en la determinación de la cantidad de gas requerida para ocupar todo el espacio de una cámara de muestra no ocupado por el material cuya densidad se desea medir. Conocido este volumen de gas, se obtiene por diferencia el volumen aparente de la muestra, y conocida su masa, se obtiene su densidad aparente. De esta manera, el polvo cuya densidad se quiere conocer se pesa y se introduce en la cámara de muestra del equipo. A continuación, el equipo realiza medidas del volumen de helio necesario para rellenar el espacio restante de la cámara de muestra, por lo que determina el volumen de las muestras y

calcula su densidad aparente. En cada ensayo de determinación de la densidad aparente, el equipo considera 10 valores, que promedia para ofrecer una medida final.

Como se ha descrito, este equipo se emplea para conocer el valor de la densidad real de polvos. Si se aplica el método del picnómetro de gas en piezas con porosidad cerrada, el valor ofrecido por el aparato, al no poder penetrar el gas en los poros cerrados de las piezas, coincidirá con el de la densidad aparente, lo que permite emplear este procedimiento como comprobación del valor dado por el método de Arquímedes y con el instrumento Geopyc (el cual se explica a continuación), permitiendo también, al analizar y comparar ambos valores, constatar si efectivamente, como se presupone, la porosidad de las piezas es cerrada.



Fig. 2.18: Esquema de funcionamiento de un picnómetro de gas. El He entra al equipo con la apertura de la válvula “a” y llena la cámara de muestra hasta que se alcanza el equilibrio. Entonces se abre la válvula “b” y en la cámara siguiente se realiza la medida del volumen de gas, hasta que se alcanza nuevamente el equilibrio. A continuación, se abre la válvula “c” y el gas se libera, volviéndose a la situación inicial del sistema. (Reproducida con permiso de Micromeritics Instrument Corp.).

2.2.1.5- Medición de la Densidad Aparente

2.2.1.5.1- Método de Arquímedes

Para medir la densidad aparente de las piezas densas obtenidas por prensado isostático, se siguió el método de desplazamiento de líquidos, que se basa en el principio de Arquímedes. El volumen de una muestra se calcula por la masa del volumen de líquido que se desplaza mientras la muestra se sumerge en dicho líquido. La determinación de la densidad aparente con el método de Arquímedes se logra con la medición de tres masas de la misma muestra. Inicialmente se pesa la muestra seca (m_{seco}). A continuación, se sumerge en agua mili-Q durante 24 horas, o en una olla a presión con agua hirviendo durante 1 hora, para garantizar que si la muestra tiene algún poro el agua sea absorbida. Transcurrido ese tiempo, se pesa otra vez ($m_{\text{húmedo}}$). Por último, se pesa la muestra sumergida en agua mili-Q con una balanza hidrostática ($m_{\text{sumergido}}$). La densidad aparente se obtiene directamente mediante la siguiente ecuación (Eq. 2.3):

$$\rho = \frac{m_{\text{seco}}}{m_{\text{húmedo}} - m_{\text{sumergido}}} \cdot \rho_{\text{agua}}$$

[Eq. 2.3]

2.2.1.5.2- Geopyc

Para contrastar los resultados de densidad aparente obtenidos siguiendo el método de Arquímedes, se empleó el equipo Geopyc 1360® de Micromeritics. Este equipo consta de un cilindro que está provisto de un émbolo acoplable, en el interior del cual se introduce la muestra y un material denominado Dryflo®. El DryFlo® es lo que se denomina fluido sólido y consiste en esferas de 100 μm de diámetro de un material muy resistente a la compresión. Este material cuasifluido, sustituyente de aceites y mercurio, no moja la muestra ni llena sus

poros. Con sacudirla o limpiarla con un pincel se eliminan todos los restos de este fluido sólido lo que permite repetir la medición.

Cuando se lleva a cabo un ensayo hay que llenar previamente el cilindro con el DryFlo® y realizar un ciclo en blanco para saber exactamente qué volumen ocupa. Acto seguido se introduce el material y el equipo comprime el conjunto muestra/fluido sólido para poder saber así, por diferencia de volúmenes, el volumen que ocupa la muestra. Conocido el peso y el volumen se calcula densidad aparente.

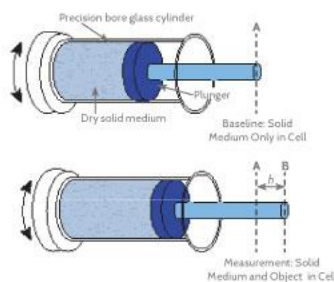


Fig. 2.19: Esquema de funcionamiento del sistema Geopyc®. La diferencia de volúmenes entre la medición A y la medición B es el volumen que ocupa la pieza en cuestión. (Reproducida con permiso de Micromeritics Instrument Corp.).

2.2.1.6- Porosimetría de mercurio

La porosimetría por inyección de Hg es una técnica indirecta para la caracterización del sistema poroso de los materiales, obteniéndose fundamentalmente a partir de ella el área y el volumen de los macro y mesoporos, además de la distribución de la porosidad del material. Esta técnica se basa en la aplicación de presión para así forzar la entrada del mercurio en el entramado poroso del sólido.

Esta técnica se empieza a aplicar hacia 1940, y es en 1945 cuando Ritter y Drake son los primeros en publicar la descripción del equipo y datos experimentales obtenidos con el mismo (341).

Se basa en los fenómenos de capilaridad generados por los líquidos que no mojan los sólidos con los que están en contacto. Así, de acuerdo con la ecuación de Washburn (Eq. 2.4-2.6), un líquido como el mercurio que no penetra espontáneamente en los conductos capilares, precisa una presión "p" para su introducción que es inversamente proporcional al radio "r" de los mismos (308):

$$r = 2 \sigma \cos \alpha / p$$

[Eq. 2.4: Ecuación de Washburn]

- " σ ": Tensión superficial del mercurio.
- " α ": Ángulo de contacto sólido-líquido.

La porosidad abierta (π) (porosidad accesible a la intrusión de mercurio) se da como:

$$\pi = V_{\text{intrusión}} / V_{\text{esponja}}$$

[Eq. 2.5]

- $V_{\text{intrusión}}$: Volumen de intrusión total de mercurio.
- V_{esponja} : Volumen del andamio.

Finalmente, la porosidad cerrada (ϖ), porosidad no accesible al mercurio, se puede determinar cómo:

$$\varpi = \Pi - \pi$$

[Eq. 2.6]

- Π : Densidad total de la estructura porosa (determinada como $\Pi = 1 - \rho_{\text{esponja}} / \rho_{\text{material}}$; donde ρ_{material} es la densidad real del material con el que está fabricada la esponja y ρ_{esponja} es la densidad aparente de la estructura porosa, llamada esponja).

En el presente trabajo se ha realizado el análisis de porosimetría de mercurio para determinar el volumen de poros, así como la distribución

de los mismos en los materiales comerciales (KeraOs® y Bio-Oss®) y de las esponjas sintetizadas de HA y β -TCP, para comprobar que estas últimas poseían igual porosidad y distribución de poros entre sí. Para ello, se ha empleado un porosímetro AUTOPORE II 9215® (Fig. 2.21), el cual está asociado a un ordenador para la recogida y tratamiento de los datos. Para la realización del análisis se selecciona la muestra, teniendo en cuenta que para las muestras más porosas se debe emplear una mayor cantidad, de manera que se respeten los límites de medida del capilar del penetrómetro, establecidos entre el 25 y el 90% del volumen del capilar. Previamente, la humedad presente en la muestra debe ser totalmente eliminada. Para proceder a la medición, se pesa el penetrómetro con la muestra y se coloca en posición horizontal en el equipo. Inicialmente se realiza un vacío para liberar el interior del penetrómetro de gases atmosféricos y vapores (generalmente agua), luego se introduce el mercurio hasta rebosar y el exceso es retirado de la base del penetrómetro. A la mínima presión, que se emite al comienzo del análisis, el mercurio solo puede penetrar en los poros grandes de la muestra ($> 360 \mu\text{m}$). Tras esta primera etapa, el penetrómetro es retirado del puerto de baja presión, se pesa y se coloca en el puerto de alta presión. El análisis a alta presión se realiza entre la presión atmosférica y 2000 atm. Para alcanzar estas altas presiones el penetrómetro se sumerge en una cámara de aceite hidráulico que transmite la presión generada en las bombas. A medida que el mercurio entra en la red porosa del material, el espacio ocupado por la muestra en el capilar disminuye. Como el mercurio penetra en los poros, su nivel en el capilar cae y la cantidad (relacionada con el volumen de los poros) es registrada. La inversión de la bomba hidráulica disminuye la presión, lo que permite la generación de datos de extrusión. Al final del análisis, los datos de volumen de mercurio, tanto en baja como en alta presión, se representan en una gráfica correlacionando el diámetro del poro con la intrusión acumulada (342) (Fig. 2.20)

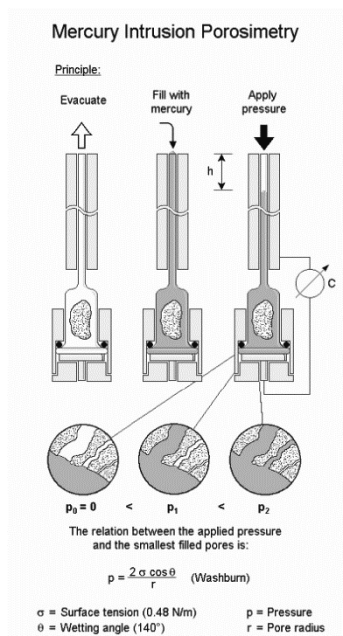


Fig. 2.20: Imagen en la que se muestra la relación existente entre la presión aplicada y la porosidad ocupada. (Reproducida con permiso de Micromeritics Instrument Corp.).

Es necesario tener en cuenta que con esta técnica sólo se consideran poros abiertos, accesibles al mercurio, y que se trabaja con presiones elevadas, lo cual puede alterar la geometría del medio poroso. Además, se emplea un material peligroso, como es el mercurio, por lo que deben extremarse las normas de seguridad. Por último, se trata de un ensayo irreversible, es decir, la muestra no se recupera dado que el mercurio queda atrapado en el sistema de poros.

Como ventajas, cabe destacar que es un ensayo que se realiza de forma simple y rápida, que mide un amplio intervalo de tamaños y las curvas porosimétricas obtenidas tras el ensayo, además de aportar un valor cuantitativo, pueden ser contempladas como una “huella dactilar” del sistema poroso, siendo denominadas por algunos autores como “espectro de la porosidad”.



Fig. 2.21: Imágenes que muestran (a) el porosímetro AUTOPORE II 9215® y (b) el penetrómetro o portamuestras en detalle.

2.2.1.7- Medición de la superficie específica

La superficie específica es una medida aplicada a sólidos con granos o partículas; y se trata del área de superficie por unidad de masa del material.

La caracterización de los polvos de HA y β -TCP obtenidos en las síntesis, así como de los materiales comerciales Bio-Oss® y KeraOs®, se ha realizado en un equipo Gemini 2360 de Micromeritics®. La desgasificación previa de las muestras se hizo con N_2 a 200°C en un FlowPrep 060 de Micromeritics® y posteriormente se pesan y se introducen en el equipo que las enfría a 77 °K para realizar la medición.

Este equipo calcula la superficie específica de la muestra basándose en el método desarrollado por Brunauer-Emmett-Teller (BET) (343), que asume que un gas, como por ejemplo el nitrógeno bajas temperaturas, va a adsorberse sobre superficies sólidas limpias y llenará toda la superficie disponible formando capas múltiples. La ecuación BET (Eq. 2.7 y Eq. 2.8), permite el cálculo de la monocapa del N_2 adsorbido con el área superficial del sólido en cuestión.

La ecuación BET es la siguiente:

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_M \cdot C} + \frac{C - 1}{V_M \cdot C} \cdot \frac{P}{P_0}$$

[Eq. 2.7]

VM = volumen de la monocapa

V = volumen adsorbido

P = presión sobre la muestra

P0 = presión de vapor de saturación

C = constante

Esta ecuación se simplifica llegando a la siguiente expresión (Eq.2.3):

$$A_{BET} = V_m \cdot N \cdot A_m$$

[Eq. 2.8]

A_m equivale al área de la sección de la molécula que actúa de adsorbato y se asume que para el nitrógeno este valor es de 0.162 nm^2 a 77 °K . N representa el número de Avogadro, y V_m es el volumen de la monocapa adsorbida.

En el Equipo Gemini, el N_2 fluye sobre la muestra como un componente de una mezcla con He, la cantidad de N_2 adsorbido se determina con un detector de conductividad térmica. Este equipo da información de BET por punto simple o multi punto y, además, da información de volumen de poro.

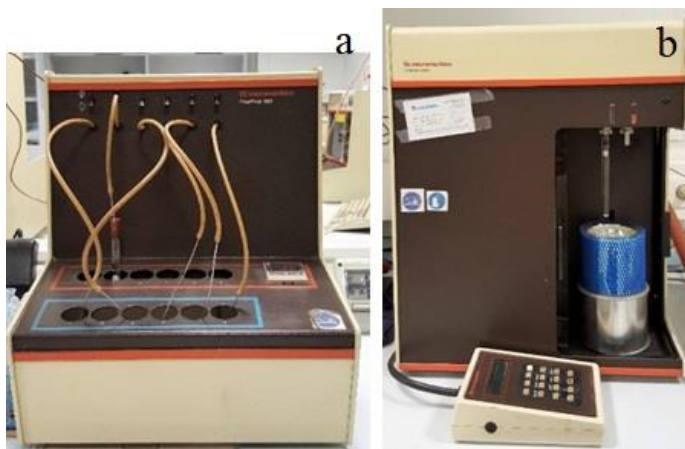


Fig. 2.22: Imágenes que muestran (a) el equipo FlowPrep 060 de Micromeritics® donde se desgasifican las muestras y (b) el equipo Gemini 2360 de Micromeritics® donde se realiza la medición de la superficie específica.

2.2.1.8- Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (“Scanning Electron Microscopy”, SEM) es una técnica de análisis de materiales tanto orgánicos como inorgánicos que proporciona información acerca de la morfología de la superficie de los sólidos, lo que proporciona información sobre la microestructura de los materiales y, con el empleo de los accesorios adecuados, permite incluso realizar un microanálisis elemental. Su funcionamiento se basa en que un fino haz de electrones pasa a través de lentes condensadoras y del objetivo y es dirigido a lo largo de la muestra a estudiar por las bobinas de barrido, mientras que un detector identifica el número de electrones secundarios de baja energía que son emitidos por cada punto de la superficie de la muestra. Al mismo tiempo, se utiliza el foco de un tubo de rayos catódicos para proporcionar contraste a la imagen. El voltaje de aceleración de un microscopio de barrido va desde 2 kV a 40 kV y su resolución se encuentra entre 20 – 50 Å.

Por tanto, en el microscopio electrónico de barrido a partir de la irradiación de las muestras con un haz de electrones, se estudian las superficies de las mismas. Dicha irradiación produce diferentes radiaciones emergentes, las cuales son:

- Electrones secundarios, sensibles al relieve y con los que se estudia la superficie de la muestra.
- Electrones retrodifundidos, cuya intensidad es proporcional al número atómico de la muestra. Esta radiación permite obtener imágenes en las que se distinguen zonas de la muestra con distinto número atómico según la tonalidad de gris que presenten, mostrándose más oscuras las partes más pesadas y más claras las zonas más ligeras.
- Fluorescencia de rayos X, constituida básicamente por fotones característicos de los elementos presentes en la muestra. El análisis de este espectro de rayos X permite estudiar cualitativa y cuantitativamente los elementos constituyentes de la muestra. En función de la característica de la radiación que se mide, se dispone de dos técnicas analíticas distintas: espectroscopía por dispersión de energías (EDS) y espectroscopía por dispersión de ondas (WDS). La primera mide la energía de los fotones emitidos y es una técnica adecuada para el análisis cualitativo y semicuantitativo. La segunda determina las longitudes de onda de los fotones y permite obtener microanálisis cuantitativos sin interferencias espectrales.

La preparación de una muestra para su estudio en microscopía electrónica de barrido varía en función de su estado y de su naturaleza conductora o aislante de la corriente eléctrica. En primer lugar, debe estar libre de humedad; a continuación, las muestras sólidas se pegan a un soporte metálico (de Cu) con el adhesivo adecuado. Dado que es necesario que la superficie de la muestra sea conductora para que los electrones no queden retenidos, ésta se recubre con una capa de Au-Pd en un metalizador. Así las imágenes obtenidas son de mayor resolución, sin alteraciones en el resultado porque los electrones retenidos repelen a los del siguiente haz.

A lo largo de este trabajo la técnica de microscopía electrónica de barrido fue empleada para la observación de la microestructura de los materiales previa a su implantación en los animales; es decir, de los materiales comerciales, y de los materiales sintetizados, tanto densos como porosos.

El microscopio empleado es un JEOL JSM-6400 (Fig. 2.23), que presenta una resolución de 1.5nm/5.0nm y una gama de aumentos de 10X a 30000X. El equipo utilizado para la metalización es un Emitech K550 Sputter Coater, que opera a 40 mA con un tiempo de deposición de 3,5 minutos.



Fig. 2.23: Imagen del microscopio JEOL JSM-6400 utilizado.

2.2.1.9- Microscopía óptica

Para el análisis de las preparaciones histológicas, así como los diferentes granulados injertados en el presente trabajo, se han empleado la microscopía óptica de luz transmitida y de luz reflejada. El microscopio estereoscópico, se trata de una lupa formada por un soporte

y dos lentes biconvexas, que producen pocos aumentos, pero permiten observar la muestra tridimensionalmente en un campo de visión mayor. El mecanismo del microscopio compuesto se basa en la transmisión de luz visible y no visible (desde la ultravioleta a las radiaciones infrarrojas) a través de un sistema óptico de lentes y/o prismas y/o espejos permite aumentos del orden de 1500 a 2000 y tiene un poder de resolución de 0.2 μm . Las partes que conforman un microscopio compuesto son el sistema mecánico, que contiene el estativo o soporte, la platina sobre la que se coloca la preparación histológica y los mandos de movimientos vertical y horizontal; el sistema de iluminación, que son las piezas encargadas de iluminar la muestra para que la imagen pueda ser ampliada; y el sistema óptico, encargado de proporcionar dicha ampliación del espécimen, que consta de los objetivos, oculares y el condensador, y es el sistema encargado de aumentar las imágenes objeto de observación.

El microscopio de luz transmitida utilizado está provisto de un polarizador Nikon modelo OPTIPHOT2-PQL, con oculares de 10X y 22 mm y objetivos de 4X, 20X, 40x y 100X junto con un sistema de microfotografía digital OLYMPUS con una cámara DP-12 de 3.3 Mpixels (Fig. 2.24).



Fig. 2.24: Microscopio de luz transmitida OPTIPHOT2-PQL OLYMPUS SZX12, con cámara DP-12 de 3.3 Mpíxels.

El microscopio estereoscópico que se empleó es un OLYMPUS SZX12, también con una cámara DP-12 de 3.3 Mpíxels. También se ha

empleado un microscopio Leica DCM8 asociado a un software para realizar mediciones de alta velocidad y alta resolución para la metrología de las superficies de los materiales directamente en ordenador.



Fig. 2.25: Microscopio estereoscópico OLYMPUS SZX12, con cámara DP-12 de 3.3 Mpíxels.

2.2.2- MÉTODOS DE PROCESAMIENTO

2.2.2.1- Molienda

Tras ser calcinado el gel que se consigue con la síntesis de ambos materiales, es necesario reducir su tamaño de partícula para llevar a cabo su caracterización y posterior procesado. Se ha empleado un molino mortero de ágata Retsh modelo RM 0. Este molino sirve para moler, mezclar y homogeneizar materiales de blandos a muy duros en seco o en húmedo por presión y fricción. Tras la molienda, el material es tamizado por un tamiz de malla de 63 μm . el límite de molienda de este tamiz es de 20 μm según indica el fabricante.

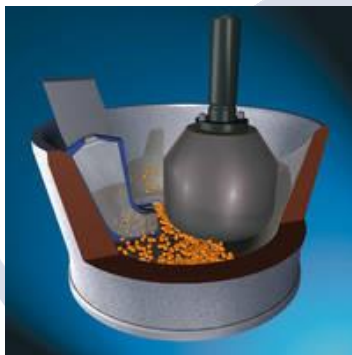


Fig. 2.26: Esquema del funcionamiento del mortero de ágata Retsh modelo RM 0, el cual mezcla y tritura por presión y fricción. La función del raspador es empujar el material en el área entre el mortero y el brazo del mortero. Esta alimentación forzada garantiza que toda la muestra se someta continuamente al proceso de molienda y trituración y también se mezcle intensamente. El brazo del mortero no está ubicado en el centro del mismo; el contacto con la base giratoria y la muestra hace que gire automáticamente. La presión de molienda necesaria se logra por el peso del brazo de mortero además de una presión ajustable con un resorte que actúa sobre el eje del mortero.

Para la preparación de las muestras para la realización de su análisis por difracción de rayos X, por tratarse de una cantidad menor, se ha empleado un molino de ágata excéntrico Retsh tipo MS.

2.2.2.2- Prensado isostático en frío

El prensado isostático en frío se trata de un método por el cual el polvo cerámico se prensa uniformemente en todas las direcciones del espacio. Para ello, el polvo es introducido en un molde flexible de goma que se introduce en un líquido que transmite la presión de manera uniforme en todos los puntos.

Las ventajas de emplear este método son que se transmite una compresión uniforme (hidrostática) que resulta en una densidad muy homogénea de la pieza; por tanto, la contracción y resistencia de dicha pieza serán uniformes y su morfología no se verá modificada. Además, elimina la porosidad interna de los materiales. La prensa isostática en frío empleada es una ISOPRESS IP4-22-60-230 de la marca AUTOCLAVE ENGINEERS (Fig. 2.27). Esta prensa funciona con agua y supera los 5000 Kg/cm³.

En el presente trabajo se ha empleado para obtener piezas en verde a partir del polvo de HA y β -TCP sin presencia de poros. Estas piezas serán sinterizadas para obtener a partir de ellas el granulado denso que será implantado.



Fig. 2.27: Prensa isostática ISOPRESS IP4-22-60-230.

2.2.2.3- Método de replicación de esponja

El método de replicación de esponja fue patentado por Schwartzwalder y Somers en 1963. Se trata del método más popular, simple, flexible y efectivo de fabricar esponjas cerámicas de poros interconectados de morfología controlada en ingeniería de tejidos. Para llevar a cabo este método, es necesario emplear un material cerámico en suspensión. A través de este método se obtienen esponjas con una morfología muy similar a la arquitectura del hueso esponjoso. La esponja o espuma a partir de la que se obtiene el andamio formado por el biomaterial puede estar fabricada de un material sintético, generalmente poliuretano, o de un material natural, como por ejemplo el coral. Una ventaja de este método es que permite que la esponja sea cortada y conformada según el tamaño y forma del defecto y, en definitiva, las necesidades del paciente.

El método consiste en impregnar la plantilla-esponja en una barbotina compuesta por un material cerámico y un agente ligante (Fig. 2.28). Posteriormente, se exprime la esponja para remover los excesos y se deja a secar. Este paso es de vital importancia, pues sin él los poros permanecerían cerrados. A continuación, se somete el conjunto a la temperatura de calcinación del revestimiento (entre 300 y 800 °C), y finalmente se eleva la temperatura para proceder a la sinterización y densificación del revestimiento cerámico, que varía en función del material. De este modo, conserva la morfología de la plantilla-esponja (réplica en positivo) (344).

Los factores más decisivos en este método son la reología de la suspensión, y la adhesión de dicha suspensión a la estructura de la esponja. La barbotina debe ser lo suficientemente fluida para penetrar en la estructura de la esponja, pero con la viscosidad suficiente para que la estructura tenga las propiedades mecánicas adecuadas y no se descomponga, también para evitar que se acumule en la base de la esponja mientras se deja secar. Para obtener esta viscosidad necesaria, se añaden ligantes y plastificantes a la barbotina, se este modo se previene la formación de grietas durante la eliminación del material polimérico (345).

Las cerámicas obtenidas mediante este método de replicación de esponja obtienen valores de porosidad interconectada muy elevados, que oscilan desde el 40 al 95%. Los tamaños de poro van desde 200 μm hasta 3 mm. Según los autores, este tamaño mínimo se limita a 200 μm debido a que no es posible realizar la impregnación de esponjas con tamaños menores de celdas (346).

La desventaja de esta técnica es que el esqueleto de la estructura cerámica se agrieta durante la pirolisis del material polimérico y, como resultado, disminuye las propiedades mecánicas del material. Por tanto, la calcinación del material sintético debe ser lo más lenta posible, para evitar la acumulación de presión en la estructura y que esta contenga imperfecciones. Generalmente se emplea una rampa de calentamiento de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

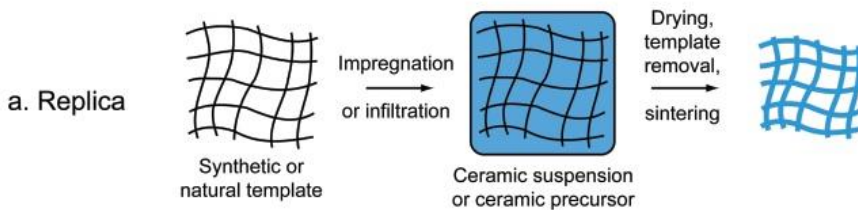


Fig. 2.28: Esquema del método de replicación de esponja. Imagen modificada de (347), con permiso de John Wiley and Sons, N° de licencia 4433860032731.

2.2.2.4- Calcinado y sinterización

La sinterización es un proceso por el que un polvo prensado, denominado cuerpo en verde, es transformado en un cuerpo cerámico denso y resistente, después de haber sido calentado a una temperatura suficiente como para estimular los mecanismos de transporte de materia y los cambios de fase, pero inferior al punto de fusión total del material tratado. La sinterización puede ocurrir en presencia o en ausencia de fase líquida. En esta tesis, para la fabricación de las piezas de las que se

obtuvieron los granulados denso y poroso, se ha empleado la sinterización en estado sólido.

La sinterización en estado sólido es la unión y densificación de las partículas de un material cuando se les aplica un tratamiento térmico a una temperatura inferior a su punto de fusión. A lo largo del proceso, la fuerza conductora del mismo es la reducción de la energía total del sistema, de forma que durante la sinterización, las interfases sólido-vapor se transforman en interfases sólido-sólido (348). Esto puede conseguirse tanto mediante la densificación del material como mediante el crecimiento o engrosamiento de los granos, o bien mediante una combinación de ambos efectos, como se puede apreciar en la Fig. 2.29.

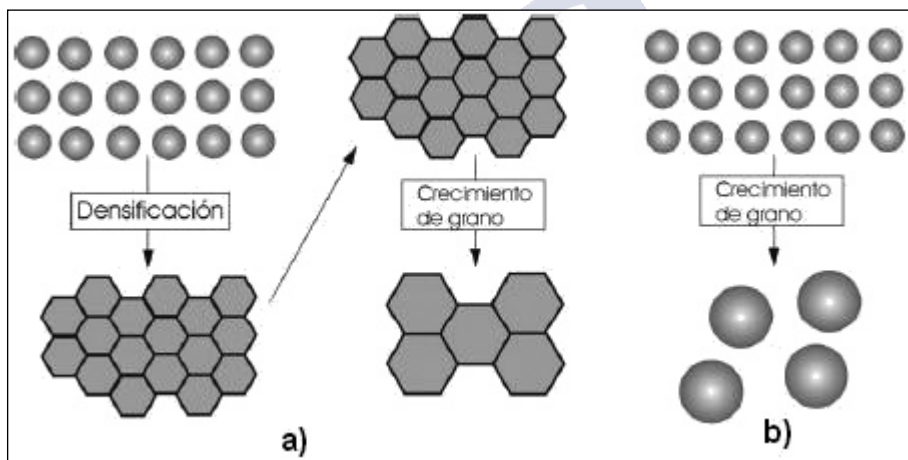


Fig. 2.29: Procesos que pueden llevar a la disminución de energía de un conjunto de partículas durante la sinterización: a) Densificación seguida de crecimiento de grano y b) aumento del tamaño de grano, donde el crecimiento se realiza a expensas de los granos más pequeños.

En el caso de la densificación, las partículas, que teóricamente se suponen como esféricas, cambian de forma, los centros de las partículas se acercan y el volumen del material decrece.

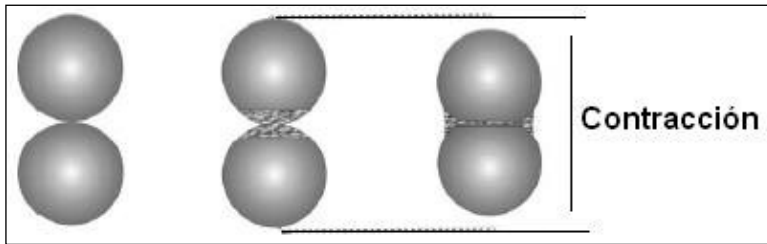


Fig. 2.30: Ilustración que muestra cómo el transporte de material desde el área entre las partículas hacia el poro conlleva contracción y conduce a la densificación.

Los principales factores a tener en cuenta y que intervienen en el proceso de sinterización pueden dividirse en dos grandes grupos: las variables relacionadas con el material y las variables relacionadas con el propio proceso de sinterización. En la Tabla 2.4 se recogen las variables más importantes dentro de cada grupo. Las variables relacionadas con el material influyen fundamentalmente en la compactación, la densificación y el crecimiento de grano, mientras que las relacionadas con el proceso deben ser controladas para poder ajustar el proceso de sinterización.

Tabla 2.4: Variables que afectan a la sinterización y la consecución de una microestructura.

<i>Variables relacionadas con el material</i>	<i>Variables relacionadas con el proceso</i>
Forma de las partículas	Temperatura
Tamaño de las partículas	Tiempo
Distribución de tamaños	Presión
Grado de dispersión	Atmósfera
Composición	Rampa de calentamiento
Grado de pureza y homogeneidad	Rampa de enfriamiento

Típicamente, un material presentará densificación y crecimiento de grano de forma simultánea durante el proceso de sinterización. Sin embargo, para poder obtener densidades cercanas a la teórica, el crecimiento de grano debe ser suprimido hasta que la mayor parte de la

contracción haya ocurrido (349). Un material en el que el crecimiento de grano es excesivo y prematuro, no densificará lo suficiente y tendrá una microestructura final porosa compuesta por granos grandes. Por este motivo, para obtener un material con una densidad lo más próxima posible a la teórica puede ser necesario modificar los mecanismos de difusión durante la sinterización, favoreciendo aquellos que mejoran la densificación y evitando los que generan crecimiento de grano.

Para modificar los mecanismos de difusión durante el proceso existen diversas posibilidades, entre las que destacan:

- Introducción de segundas fases en el borde de grano o el dopaje con ciertos elementos que cambien el estado de las cargas del borde de grano.
- Sinterización en dos etapas.
- Empleo de métodos de sinterización no convencionales.

Durante el procedimiento de obtención de HA y β -TCP por vía húmeda, se obtienen precursores amorfos con la estequiometría adecuada que necesitan su posterior calcinado para obtener la fase cristalina deseada (HA o bien β -TCP) en el polvo, el cual será procesado para conformar las piezas tanto densas como porosas. Para ello se ha empleado un horno de la marca C.H.E.S.A.® tipo HTBT, modelo S7.RP, que opera a 3700 W y 220 V. Con él se alcanzan temperaturas de 1200 °C. Este horno, también se ha empleado para la eliminación de la contaminación por carbono de los granulados a causa de su manipulación previo a su esterilización con radiación gamma.

Tras la conformación de las piezas es necesario que se sometan a temperaturas que conlleven al sinterizado adecuado de las mismas para obtener las propiedades mecánicas y las características de microestructura deseadas. Para ello se ha empleado un horno de ascensor marca THE KHANTAL CORPORATION®, que alcanza una temperatura máxima de 1650 °C y opera a 220 / 240 V y 15 A.

2.2.3- EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

2.2.3.1- Animales

En este estudio se emplearon 8 conejos blancos New Zealand macho provenientes de *Charles River Laboratories* (Francia). El peso de los animales en el momento en el que se les realizó la cirugía osciló entre 2,5 y 3 kg. La edad de los animales en dicho momento fue de aproximadamente 9 semanas.

Dichos conejos fueron alojados en jaulas individuales, cumpliendo con lo estipulado en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, en el que se indica que la superficie mínima por animal debe ser de 4200 cm² con una altura mínima de 45 cm. Se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio (temperatura media de 21°C y humedad ambiente de entre el 50 y el 60%), y se sometieron a una alimentación con una dieta también estándar (350).

Los proyectos bajo los que se realizaron las operaciones se denominan: a) DISEÑO Y EVALUACIÓN IN-VIVO DE IMPLANTES 3D PRINTING PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS, MATPRINT (IGNICIA), el cual fue financiado por la Xunta de Galicia y b) DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE MATERIALES Y SISTEMAS FUNCIONALIZADOS POR 3D PRINTING, PLATPRINT. Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia. MINECO. Los animales fueron estabulados en el animalario de AFICEGA, bajo el cuidado de personal especializado. Las operaciones se llevaron a cabo en las instalaciones de la Facultad de Medicina y Odontología por el Prof. Dr. Arturo Martínez Insua, quién está en posesión de la capacitación para diseño de proyectos de experimentación con animales; así como para el cuidado, intervención quirúrgica y eutanasia de los mismos, (Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el

personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia); por lo tanto, dispone de preceptiva autorización de la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia (Niveles B y C) (Expediente N° 411-C), y presenta amplia experiencia en cirugía experimental.

2.2.3.2- Protocolo quirúrgico

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron llevados a cabo bajo protocolos de asepsia muy estrictos. En primer lugar, los conejos fueron premedicados con Diazepam a una dosis de 0.2 ml/kg (Valium, Roche). Seguidamente se les administró Medetomidina clorhidrato solución inyectable (Domtor, Orion. Finlandia) a una dosis de 0.1 mg/Kg como sedante e inductor de la anestesia, en combinación con Ketamina (Imalgène 1000, Merial. Francia) a una dosis de 10 mg/kg. La administración de las inyecciones fue vía intramuscular en la zona postero-superior de las patas.

Los animales fueron afeitados en la zona de la incisión y márgenes, que va desde los ojos a la eminencia occipital en sentido anteroposterior, y en sentido horizontal el espacio entre ambas orejas. Dicha zona fue desinfectada con solución de povidona yodada al 10% (Betadine, Medapharma). Se infiltró un anestésico local (Ultracáin 1.8 ml, 40/0.005 mg/ml) bajo el cuero cabelludo para favorecer la hemostasia y evitar molestias en la zona de incisión.

La incisión se realizó en la zona media en sentido sagital con un bisturí de hoja N° 15. La piel el periostio fueron cuidadosamente separados con un periostotomo tipo Freer (Bontempy, Italia) hasta exponer la calota craneal, como se observa en la Fig. 2.31.



Fig. 2.31: Imagen que muestra la calota craneal y la sutura craneal tras separar el epitelio y el periostio.

A continuación, se realizaron cuatro defectos óseos subcríticos, dos a cada lado de la línea sagital sin invadir las suturas frontal y occipital, tal y como se observa en la Fig. 2.32.a. Para ello se ha empleado una trefina de 7 mm de diámetro (Bontempy, Italia) con un motor de cirugía (KaVo Intracurg 300, Karlsruhe, Alemania) a bajas revoluciones, refrigerando profusamente y en todo momento con Suero Fisiológico Vitulia 0.9 cloruro de sodio, solución para perfusión. Según la revisión bibliográfica de Delgado-Ruiz et al. (2015) (352), los defectos de menos de 10 mm sufren una curación espontánea, en cambio aquellos superiores a 15 mm de diámetro permanecen con cierre incompleto. Aun así, es necesario tener en cuenta el tiempo de curación, ya que su incremento favorece el cierre de los mismos. Para Sohn et al. (2010) (353), un defecto de 15 mm no representa un defecto crítico ya que a las 12 semanas alcanza una curación mayor del 20%. De todos modos, en este trabajo se han realizado defectos subcríticos de 7 mm, considerados ideales para evaluar la curación ósea con diferentes sustitutos, ya que permite la realización de 4 agujeros sin afectación de la línea sagital para que los diferentes materiales puedan ser comparados.

Las tablas externa e interna fueron cuidadosamente seccionadas y los discos eliminados con ayuda de una cureta Lucas y un periostotomo Freer (Bontempy, Italia), manteniendo la integridad de la duramadre como se aprecia en la Fig. 2.32.b.

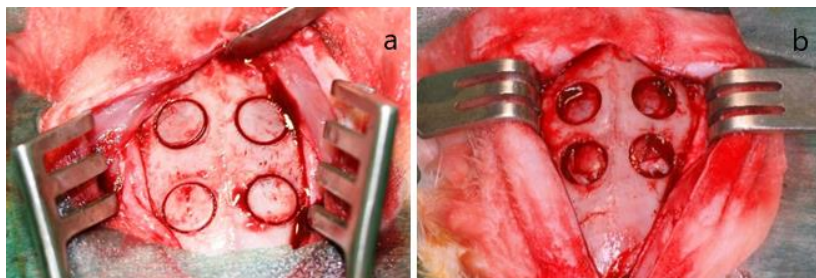


Fig. 2.32: Imágenes en las que se observan los defectos, (a) tras ser generados con la trefina todavía presentan las corticales externa e interna. (b) Los discos óseos han sido eliminados y se observa la duramadre totalmente íntegra.

De manera aleatoria, se rellenaron los defectos empleando los granulados óseos densos y de porosidad controlada de hidroxapatita y beta-fosfato tricálcico fabricados (GRUPOS DENSO Y POROSO), los sustitutos óseos comerciales Bio-Oss® y KeraOs® (GRUPO COMERCIAL); dejando algunos defectos sin relleno óseo para ejercer como control de la curación ósea (GRUPO CONTROL) (Fig. 2.33.a). Todos los defectos fueron cubiertos por una membrana colágena reabsorbible (Bio-Gide, 25x25 mm, Geistlich, Suiza) sin ser fijada con algún dispositivo adicional (Fig. 2.33.b). Finalmente, el periostio fue suturado con sutura reabsorbible monofilamento continua de poliglecaprona 25 (Monocryl 3-0, Ethicon, Edimburgo, UK), y la piel fue suturada con una sutura discontinua trenzada (Vicryl 3-0, Ethicon, Edimburgo, UK) y embebida nuevamente con solución de povidona yodada (Fig. 2.34).

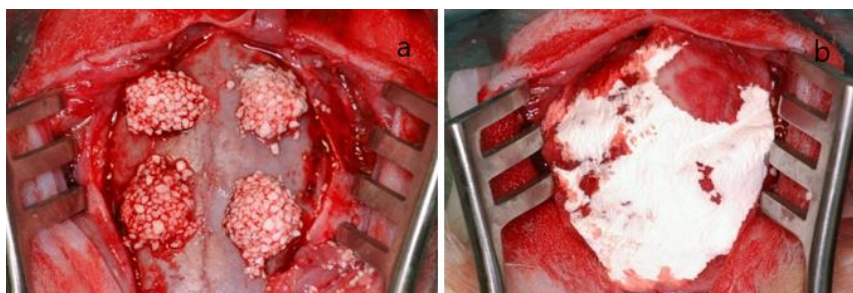


Fig. 2.33: Imágenes de (a) los defectos que han sido rellenos con material y (b) la membrana reabsorbible que se ha colocado sobre los mismos.

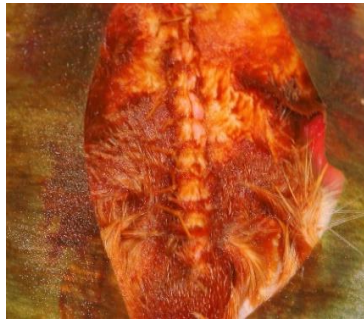


Fig. 2.34: Imagen de la calota tras la cirugía y tras ser suturada.

En el postoperatorio inmediato, se les administró una inyección intramuscular de 0.1 ml de Prednisona (Urbasón 40, Sanofi, Barcelona, España) para evitar edema, de 0.5 ml de Bencilpenicilina Benzatina (Benzetacil, polvo para solución inyectable 1200000 U/4 ml) como profilaxis de infecciones, y 0.15 ml de Metamizol (Nolotil 0.4 g/ml solución inyectable) para paliar el dolor. Las terapias analgésica y antiinflamatoria se continuaron durante las 96 horas siguientes, con administraciones cada 24 horas y, en el caso de la prednisona reduciendo la dosis gradualmente.

2.2.3.3- Defunción de los animales

Transcurridas 16 semanas, los animales fueron anestesiados siguiendo el protocolo explicado en el apartado anterior, con Medetomidina clorhidrato y Ketamina, y se sacrificaron con Pentobarbital 5 ml/kg (Nembutal®).

Tras el sacrificio, la zona de interés correspondiente a la bóveda craneal, se extrajo con una sierra dentada y con una sierra de disco de diamante empleando refrigeración. La galea aponeurótica y la duramadre se mantuvieron para evitar el daño de la zona del injerto. Sí se eliminaron la piel y el cerebro, para facilitar la infiltración de la muestra con la resina. Rápidamente, los especímenes fueron

sumergidos en solución de formaldehído en concentración del 4%, tamponado a pH 7.

2.2.4- PREPARACIÓN DE LÁMINAS DELGADAS

Para llevar a cabo el estudio histomorfométrico sobre la creación de hueso nuevo y el comportamiento celular ante los distintos injertos óseos empleados, es necesario realizar una preparación específica de la muestra. Se requiere que la muestra no esté descalcificada ya que son objeto de interés los fosfatos cálcicos y el hueso, un tejido mineralizado. Para poder hacer láminas delgadas con el espesor adecuado que permita su observación en el microscopio óptico, sin que fracture la muestra, es necesario incluirla en un bloque de hidroximetil metacrilato polimerizado. Esto permite su corte, desbastado y pulido a espesores muy reducidos sin fragmentación de la misma. Los espesores idóneos varían en función del material objeto de estudio. Para materiales muy duros, como por ejemplo el titanio, se emplean espesores de 50-70 μm . en el caso de los fosfatos cálcicos el espesor habitual oscila entre 20 y 30 μm .

En este trabajo se ha trabajado con un equipo de micro pulido EXAKT que consta de los siguientes elementos (354):

- Unidad fotopolimerizadora (luz blanca y luz UV).
- Sierra de Cinta de diamante.
- Fotopolimerizadora rápida de UV.
- Sistema de Micro pulido EXAKT 400CS.

Los pasos a seguir para la preparación de las láminas delgadas son los siguientes:

1. Radiografiar la muestra para facilitar la ubicación de los defectos. Previamente, se enjuagó en agua, ya que se encontraba sumergida en solución de formaldehído al 7-10%. Para ello, se empleó un sistema de radiografía digital indirecta

(VistaScan, Henry Schein®) empleando una placa oclusal de fósforo.



Fig. 2.35: Imagen radiográfica donde se observan los defectos que han sido regenerados transcurridas 16 semanas. A partir de la misma se realizan mediciones para tener la ubicación exacta de los mismos.

2. Fijación de la muestra. Como se ha mencionado, inmediatamente tras la extracción de la muestra, se introduce en solución de formaldehído al 7-10% en volumen tamponada con fosfato durante 10 días.

3. Deshidratación de la muestra mediante su introducción en un medio de agua/etanol incrementándose gradualmente la riqueza en etanol, según se indica a continuación:

- 70% etanol durante dos días.
- 80% etanol durante dos días.
- 96% etanol durante dos días.
- 100% etanol durante dos días.
- 100% etanol durante dos días.

4. Infiltración e inclusión. Una vez que se ha deshidratado y cortado la muestra siguiendo la información aportada por la radiografía, acotando el tamaño de modo que se

minimice al máximo la cantidad de tejido circundante a las zonas objeto de estudio, se introduce en una mezcla de etanol y resina fluida (Technovit 7200 VCL® Heraus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania), en la que se va incrementando la proporción de resina. Con esto se pretende favorecer la infiltración de resina en la muestra, ya que al ser tejido poco permeable es fácil que permanezcan zonas sin impregnarse en resina o zonas con aire. Las proporciones de resina y etanol se modifican gradualmente del siguiente modo:

- Technovit 7200®:etanol (50:50) durante dos días.
- Technovit 7200®:etanol (75:25) durante dos días.
- Technovit 7200® (100) durante dos días.
- Technovit 7200® (100) durante dos días.

A continuación, se introduce la muestra en una cubeta de polipropileno que se rellena con resina Technovit 7200 VCL® sometiéndola a vacío para evitar la formación de burbujas de aire. Seguidamente se realiza la fotopolimerización sometiéndola a un ciclo combinado de 2 horas de luz blanca de baja intensidad, y 4 horas de luz azul de alta intensidad. De este modo, se obtiene un bloque de resina con la muestra incluida en la misma.

5. Fijación del bloque. El bloque se extrae del molde y se realiza un corte en una sierra circular (IsoMet LS, Buheler®) para que la muestra quede correctamente orientada cuando es pegada sobre el primer portaobjetos. Es importante que este corte presente la dirección adecuada, paralela a la zona que se pretende estudiar, pues será la guía a partir de la cual se obtendrán las láminas delgadas; ya que este primer portaobjetos determinará la posición de los posteriores (paralelos al mismo), que son los que portarán las láminas. En este caso, se situó paralelo al eje horizontal de la calota craneal.

6. Colocación de un segundo portaobjetos. Una vez descubierta la zona a estudiar (en la zona opuesta al portaobjetos 1), se realiza un micropulido de la superficie con el sistema a EXAKT 400CS (Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania) con paños de diferente tamaño de grano hasta conseguir una superficie especular. A continuación, se pega un segundo portaobjetos sobre dicha zona empleando el pegamento Technovit 7230® y la prensa de pegado muestra (EXAKT 402-Vacuum Adhesive Press, Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania) (Fig. 2.36). Es de vital importancia calcular el espesor de pegamento que une el segundo portaobjetos al bloque, ya que a partir de ese cálculo se determinará el espesor de la muestra. Para ello es necesario medir el complejo conformado por el portaobjetos 1 y el bloque de resina que contiene la muestra, seguidamente se mide el espesor del portaobjetos 2. Una vez que se ha pegado este al bloque de resina y portaobjetos 1 (conformando un “sándwich”), se mide la totalidad del espesor de dicho “sándwich” (Fig. 2.37). Con estos datos, se obtiene el espesor de pegamento restándole al segundo (portaobjetos 1 y 2 + bloque de resina) el valor del primero (portaobjetos 1 + bloque de resina). Como se ha mencionado, este dato es importante para realizar el corte de la muestra a la distancia adecuada del portaobjetos 2 (sobre $100\ \mu\text{m}$ + el espesor del pegamento), para así obtener la lámina delgada del espesor adecuado tras el pulido.



Fig. 2.36: Prensa de pegado del portaobjetos a la muestra (EXAKT 402-Vacuum Adhesive Press, Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania).



Fig. 2.37: Imagen de “sándwich” conformado por los dos portaobjetos y en el interior la muestra incluida en resina.

7. Obtención de la lámina delgada. Con una sierra de banda (Exakt 300 CP, System, Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania.) (Fig. 3.38.a), se realiza un corte preliminar próximo al segundo portaobjetos que tenga, aproximadamente 100-200 μm de espesor teniendo en cuenta el grosor del pegamento. A continuación, se desbasta y se pule el exceso de material hasta obtener el espesor deseado de la lámina delgada. Para ello se coloca en la pulidora (Exakt 400CS, Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania.) (Fig. 2.38.b) a través de un sistema de sujeción a vacío. En este sistema se colocan diferentes pesos que permiten regular la abrasividad del pulido, que se lleva a cabo con un movimiento de vaivén que realiza el sistema de sujeción superior, mientras en el carro inferior la superficie circular sobre

la que se colocan los paños gira. Esta finalización se realiza con paños de grano de carburo de silicio de 500, 800 y 1000 para el primer desbaste; y de 1200 y 2500 para igualar la superficie y para el pulido final. La terminación se realiza con una suspensión que contiene polvo de diamante de 1 μm y un paño de neopreno. De este modo, se obtienen láminas delgadas de entre 20-30 μm de espesor, el cual es idóneo para el estudio de los fosfatos cálcicos.

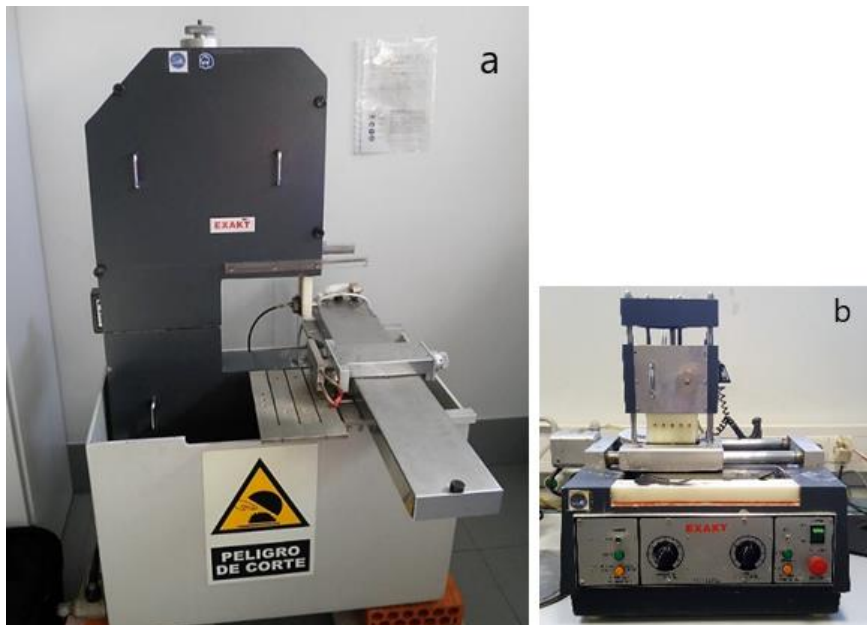


Fig. 3.38: Imágenes que muestran (a) la sierra de banda (Exakt 300 CP) y (b) la pulidora (Exakt 400 CS).

8. Tinción. Una vez obtenida la lámina delgada, es necesario someterla a un proceso de tinción para poder observar el comportamiento del tejido en el que se han implantado los biomateriales. Para ello, se ha empleado una tinción que permite valorar los diferentes grados de calcificación de los tejidos y a su vez observar tejidos conjuntivos (como por ejemplo, las fibras colágenas), cartilagosos y musculares. Esta tinción es la

Tricrómica según Wheatly/Hematoxilina de Harris; se trata de dos tinciones en las que primero se tiñe la muestra con hematoxilina durante 7 minutos, y a continuación se introduce en la tinción tricrómica durante 10 minutos. Los componentes de ambas tinciones se muestran en el Tabla 2.5. Los tonos van de un color rojo pálido para tejidos poco mineralizados a un rojo-fucsia intenso pudiendo alcanzar tonos azulados para aquellos tejidos más mineralizados. En primer lugar, es necesario lavar la muestra para eliminar los restos derivados del pulido que pueden ocasionar artefactos en la tinción. El procedimiento llevado a cabo para realizar la tinción es el siguiente:

- Calentar las tinciones a 37 °C.
- Sumergir la muestra en Hematoxilina durante 5-10 minutos.
- Aclarar con agua corriente.
- Sumergir la muestra entre 5 y 7 minutos en la disolución tricrómica.
- Aclarar con ácido acético al 2%.
- Lavar con agua destilada.
- Secar y cubrir con bálsamo de Canadá.
- Proteger la muestra con un cubreobjetos.

Tabla 2.5: Composición de las tinciones tricrómica de Wheatley y Hematoxilina de Harris.

TINCIÓN TRICRÓMICA (según Wheatley)	HEMATOXILINA DE HARRIS
Cromotropo 2R	Óxido de mercurio II
“Light green SF”	Hematoxilina
Ácido fosfotúngstico	Aluminio potasio sulfato 12 hidrato
Ácido acético glacial	Etanol 96%
Agua destilada	Agua destilada

2.2.5- ESTUDIO HISTOLÓGICO E HISTOMORFOMÉTRICO

Para el estudio histomorfométrico de las muestras se han realizado fotografías de las láminas delgadas empleando la misma magnificación de 16X, con el microscopio estereoscópico OLYMPUS SZX12 junto con un sistema de microfotografía digital OLYMPUS con una cámara DP-12 de 3.3 Mpixels.

El estudio histológico cualitativo y pormenorizado de la formación de hueso nuevo y de la interfase que se forma entre el hueso y el implante se llevó a cabo a una mayor magnificación (40X, 100X, 200X y 400X) con el microscopio de luz transmitida OPTIPHOT2-PQL y la cámara OLYMPUS DP-12 de 3.3 Mpixels nuevamente. Este microscopio permitió, con ayuda de la luz polarizada, observar el hueso neoformado.

El programa empleado para el tratamiento de las imágenes y para realizar el estudio histomorfométrico fue el ImageJ 1.50, desarrollado por el National Institutes of Health (355).

El procedimiento para registrar y medir las variables estudiadas en los grupos DENSO, POROSO y COMERCIAL, fue realizado por el mismo investigador del siguiente modo:

- Se delimitó un área de interés, que abarca el defecto desde los límites del mismo en sentido horizontal. En sentido vertical se marcó el límite superior por debajo del periostio y el límite inferior por encima del cerebro.
- Se midió en primera instancia la cantidad de material remanente en la zona del defecto (“material”).
- A continuación, se midió la superficie de tejido óseo existente en el área delimitada (“hueso”).
- El porcentaje restante correspondió con el tejido blando y cavidades medulares, no siendo objeto de estudio en el presente trabajo de investigación.

Para el grupo CONTROL solamente se midió la cantidad de hueso presente en el área delimitada, ya que en este grupo no existió presencia de ningún biomaterial.

2.2.5.1- Análisis de los datos

El análisis estadístico realizado en el presente trabajo se llevó a cabo con el programa estadístico de IBM® SPSS 24.0 (Chicago, IL, USA).

Para evaluar la reproductibilidad y el error de medición intraobservador, se seleccionaron diez diapositivas al azar y fueron medidas por el operador tres veces, en tres días diferentes. El análisis estadístico realizado fue un ANOVA por determinación de error por alfa de Cronbach.

Para verificar si los datos seguían una distribución normal, se llevó a cabo un test de Kolmogórov-Smirnov, ya que la población es $N \geq 20$ -30 datos por grupo, lo que hace necesaria dicha comprobación. También se realizó un test para comprobar la homogeneidad de las varianzas en los grupos (test de Levene).

Para estudiar la diferencia en la formación de hueso, así como de disgregación de material, según la composición química del material en cada grupo (DENSO, POROSO, COMERCIAL y CONTROL); se ha realizado un análisis de la varianza (ANOVA de 1 factor), con análisis post hoc de Scheffé.

Para determinar las diferencias en la formación de hueso y la disolución de material en los grupos DENSO, POROSO, COMERCIAL Y CONTROL, según la estructura del material para cada una de las composiciones químicas estudiadas (HA y β -TCP), se ha realizado un análisis de la varianza (ANOVA de 1 factor) y un test a posteriori post hoc de Scheffé.

Finalmente, para evaluar si existe relación entre la reabsorción de material y la cantidad de hueso nuevo formado y de qué tipo es ésta, se realizó un test para obtener el coeficiente de correlación de Pearson.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1- FRABRICACIÓN DEL GRANULADO EMPLEADO COMO SUSTITUTO ÓSEO

Como se ha expuesto en la introducción del presente trabajo, se han diseñado granulados densos y de porosidad controlada e igualada en los que la única diferencia entre ellos es la composición química, por un lado hidroxiapatita, y por otro β -fosfato tricálcico; para ser implantados en calotas craneales de conejos New Zealand y observar las diferencias en la formación de hueso que se producen entre los mismos transcurridas 16 semanas.

3.1.1- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO DENSO

Para conseguir una densidad superior al 97% en piezas cerámicas fabricadas con fosfatos cálcicos como son la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico, existen diferentes métodos. Entre ellos figuran los ya mencionados como son el dopaje con ciertos elementos, llevar a cabo la sinterización en dos etapas, o el empleo de métodos de sinterización no convencionales.

3.1.1.1- Hidroxiapatita

3.1.1.1.1- Influencia de la temperatura y tiempo de sinterización en la densificación de HA

En el caso de la HA, se han realizado diferentes investigaciones para conseguir piezas compuestas por este mineral de elevada densidad, con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas y emplearlas en ubicaciones en las que los implantes estén sometidos a carga.

El proceso de sinterización de la HA ha sido ampliamente documentado. Características como oscilaciones en la relación molar Ca/P, el método de síntesis del material y la presencia de humedad en la HA sintetizada por vía húmeda o de etanol en la HA obtenida por vía

mecanoquímica, entre otros, afectan al comportamiento de este material durante el sinterizado.

La temperatura máxima a partir de la cual se produce la formación de fases secundarias de forma irreversible como α o β -TCP, tetrafosfato de calcio (TTCP), pirofosfato cálcico ($\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_7$) u óxido de calcio (CaO), a causa de la deshidroxilación de la hidroxiapatita en su fase hidratada en fosfatos cálcicos ahindros, oscila entre 1200 °C y 1450 °C. Para Liao et al. (1999) (356) y Ruys et al. (1995) (357) esta temperatura de descomposición se encuentra por encima de los 1350 °C. Wang et al. (1998) (358) determina que comienza a los 1300 °C; y hay autores como Kothapalli et al. (2004), que han documentado que es a 1200 °C cuando se produce la descomposición de HA en α -TCP, β -TCP o CaO (359). La transformación de HA en estos productos de descomposición resulta en el deterioro de las propiedades mecánicas y también produce variaciones volumétricas (360).

La temperatura a la que propiedades mecánicas como la dureza Vickers y la resistencia a la tracción son máximas es de 1050 °C, por lo que se encuentra por debajo de la máxima temperatura de sinterizado de 1200 °C (357,361).

La densidad real de la hidroxiapatita tiene un valor, según diferentes autores, de entre 3.13 (362) y 3.156 g/cm³ (363,364). En las investigaciones llevadas a cabo en la presente tesis, se han obtenido densidades reales para el polvo que difieren ligeramente en función de la temperatura a la que haya sido sometido, tanto en el calcinado como en el sinterizado del mismo. Para los diferentes calcinados, se han hallado diferencias entre el valor de la densidad real del gel seco y de los polvos sometidos a tratamiento térmico, pero sin mostrar diferencias significativas de estos últimos entre sí. La densidad real del polvo de gel seco de hidroxiapatita fue de 2.66 g/cm³; y para los calcinados a 750, 800, 850 y 1000 °C fue de 3.13 g/cm³. La densidad real de los polvos obtenidos de piezas sinterizadas a 1150, 1175 y 1200 °C fue de 3.14 g/cm³.

Durante la sinterización, los análisis demuestran que el inicio de la misma tiene lugar entre 400 y 750 °C, en función del método de síntesis que se haya llevado a cabo para obtener el material. La contracción inicial (aproximadamente de un 2% del volumen) se debe a la pérdida de agua. A esta temperatura se produce el 65% de la sinterización a causa de la unión a través de los cuellos de las partículas. Pero es en la segunda etapa en la que se consigue la mayor parte de la densificación gracias a la contracción de los poros, en esta etapa también se produce una pérdida de peso a causa de la pérdida de los grupos hidroxilo. A temperaturas de entre 750 y 1020 °C se logra el 85% de la densificación, pero todavía permanecen poros residuales. A temperaturas entre 1100 y 1250 se alcanza el 98% de la densificación sin que tenga lugar el crecimiento de grano; y es a partir de 1250 °C cuando se produce el mismo (365).

Ramesh et al. (2012), obtienen densidades del 97%-99% de la densidad real para temperaturas de entre 1050 y 1100 °C en muestras fabricadas con HA sintetizada en laboratorio, y confeccionadas mediante compactación uniaxial a presiones de entre 1.3 y 2.5 MPa y posteriormente prensado isostático a 200 MPa (Fig. 3.1a). Gibson et al. (2001) también obtienen densidades de entre el 97 y el 98% en pastillas confeccionadas con prensado uniaxial y sinterizadas a 1200 °C (Fig. 3.1b) (361,363).

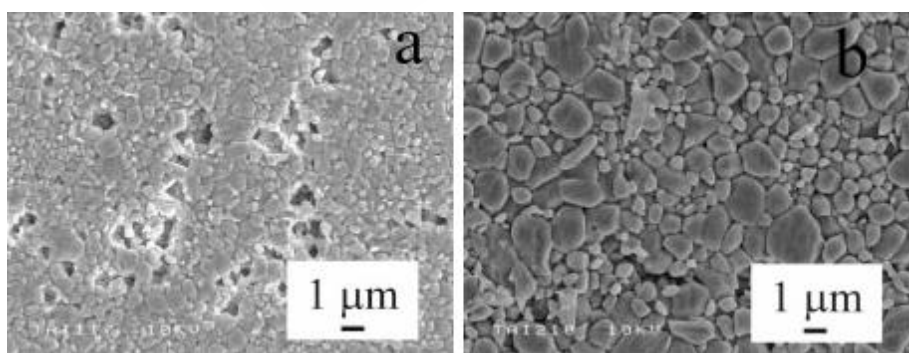


Fig. 3.1: Imágenes de superficies pulidas de HA sintetizada por vía húmeda, prensadas uniaxialmente a 200 MPa y sometidas a temperaturas de sinterización de (a) 1100 °C y (b) 1200 °C. Se observa como en la primera todavía hay presentes poros debido a la

baja temperatura. Imágenes adaptadas de (363), con permiso de Springer Nature, N° de licencia 4425370002190.

En el presente trabajo, tal y como se especificará a continuación, los valores más elevados de densidad aparente se obtuvieron en tratamientos térmicos de 1200 °C durante 2 horas. Estos oscilaron entre el 96.7% y el 99.7%, con una media de 99.2%. A esta temperatura, no se observaron fases secundarias ni descomposición de la HA en TCP, TTCP o CaO, como se puede apreciar en la Fig. 3.2, dónde se muestra un difractograma del material tras ser sometido a una temperatura de sinterización de 1200 °C.

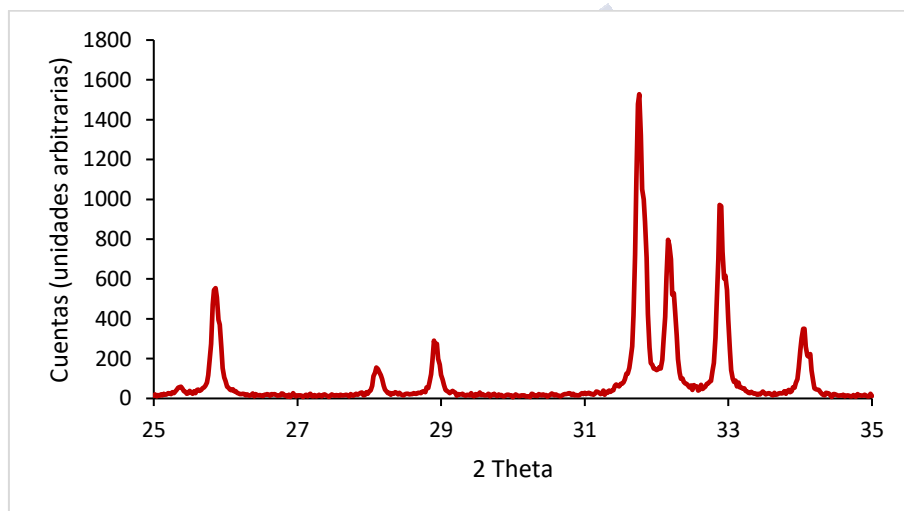


Fig. 3.2: Gráfica del resultado del estudio de difracción de rayos X realizado a la pieza a partir de la cual se sintetizó el granulado denso, una vez sometida a 1200 °C. En la misma se observan los picos característicos de hidroxiapatita (ficha JCPDS N° 89.6437 según las bases de datos del ICDD) con un elevado grado de cristalización, sin presencia de fases secundarias, lo que indica que no se produce una degradación del material.

Un método empleado por diversos autores para incrementar la densificación durante la sinterización de piezas densas es alargar el tiempo de meseta o de permanencia a la temperatura máxima densificación (hasta 4 horas). Por otra parte, es necesario tener en cuenta que una rampa de calentamiento demasiado rápida (de

10 °C/min, por ejemplo), puede resultar en un descenso de la densidad a causa de la descomposición parcial de HA en TCP (363). En esta ocasión, se han alcanzado densidades elevadas y niveles de sinterización adecuados con una meseta de permanencia de 2 horas de duración; por tanto, se ha decidido emplear la temperatura de 1200 °C para sinterizar las piezas de las que se obtendrá el granulado denso y mantener la meseta durante 2 horas. Las rampas de calentamiento y enfriamiento han sido de 5 °C/min y de 10 °C/min respectivamente, tal y como se muestra a continuación en la Fig. 3.8.

3.1.1.1.2- Métodos de procesamiento citados en la literatura para incrementar la densificación de HA

Con respecto a la atmósfera en la que tiene lugar la sinterización de HA, no existen diferencias significativas entre realizar el proceso en aire o en una atmósfera inerte (N₂, O₂, Ar), pudiendo obtenerse una mejor sinterabilidad en vacío; aunque sí se produce un retraso del proceso cuando se lleva a cabo en presencia de dióxido de carbono (366). En esta ocasión, el sinterizado de las piezas de las que se ha obtenido el granulado denso ha tenido lugar bajo atmósfera en aire.

Otra opción estudiada acerca de la posibilidad de evitar el crecimiento de grano y aumentar la densidad es el uso de aditivos. Con respecto a esto, se han empleado Li⁺ y Mg²⁺ para conseguir elevadas densidades en materiales con bajas densidades en verde, logrando mejores resultados con el primer elemento que con el segundo (367). Otros metales empleados son el Sr, el Zn, el K, el Bi o el Y; pero sus investigaciones no aportan resultados claros ya que el proceso de sinterización no ha sido detallado. Además, en la mayor parte de los mismos se han empleado temperaturas muy elevadas (por encima de 1250 °C), o bien una HA con estequiometría no controlada, lo que ha dado lugar a la formación de fases secundarias (365). En este trabajo de investigación, no se ha contemplado la posibilidad de añadir aditivos, ya que se buscaba trabajar con materiales de hidroxiapatita de elevada pureza para implantar en animales vivos.

Otro método documentado para inhibir el crecimiento de grano es el denominado “sinterizado en dos pasos”. Este método se basa en el hecho de que el crecimiento de grano se produce en el estadio final del sinterizado, y consiste en suprimir la migración al borde de grano responsable de dicho crecimiento, mientras que mantener la difusión hacia el borde de grano promueve la densificación. Para ello, la muestra debe ser calentada a una temperatura lo suficientemente elevada hasta alcanzar una densidad relativa del 70% de la densidad real, para ser rápidamente enfriada y calentada a una temperatura inferior hasta que se completa la densificación (368).

Diversos autores, a raíz de los resultados obtenidos en sus investigaciones, concuerdan que las técnicas más reproducibles para obtener piezas densas son aquellas en las que se emplea el sinterizado asistido físicamente. En estas, una fuerza adicional promueve la densificación y previene el crecimiento de grano disminuyendo la temperatura necesaria y el tiempo de sinterización. Estas técnicas son el prensado uniaxial y el prensado isostático en caliente (con las siglas en inglés HP o HIP) (369,370), bien realizado directamente sobre el material en crudo; o bien sometiendo a estos tratamientos piezas que han sido coladas y sinterizadas a baja temperatura previamente. Otras técnicas son el sinterizado por microondas, en las que el calor es generado internamente en el material a través de radiación electromagnética (371); o el Flash Spark-Plasma Sintering (SPS), en el que se aplican simultáneamente corriente eléctrica y fuerza de compresión (372). Aun así, la producción de piezas a través de estos métodos requiere aparatología de elevado coste y, como es en el caso del SPS, una operación post-sinterización, a causa de la polarización creada, lo que incluye la combinación de dos procesos en uno, dificultando el procedimiento.

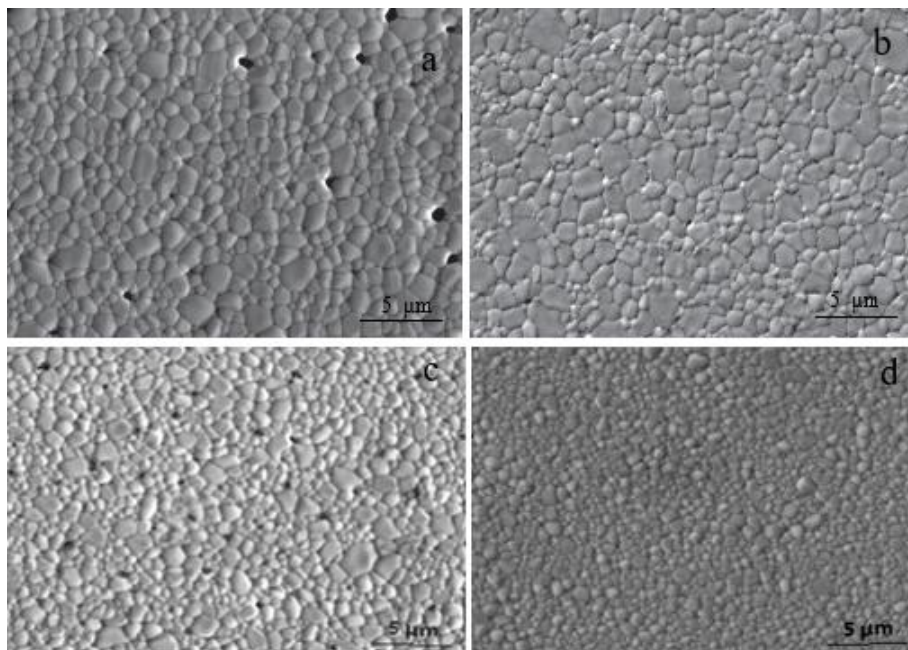


Fig. 3.3: Imágenes que muestran cómo afecta el HIP al incremento de la densificación. La imagen (a) muestra la superficie pulida de una pieza obtenida a partir de un colado sinterizado a 1160 °C, y la imagen (b) muestra la misma pieza tras ser sometida a HIP. La imagen (c) representa una superficie pulida de una pieza tras ser sinterizada a 1130 °C, y la imagen (d) la misma pieza tras HIP. Imágenes tomadas de (370), con Licencia Creative Commons Atribución 2.0 Genérica (CC BY 2.0) y (373), con permiso de Elsevier, N° de licencia 4425360714097.

Los estudios sobre la densificación de la HA coinciden en que la HA obtenida en laboratorio alcanza mayores densidades a menores temperaturas que la HA comercial. A pesar de conocer ciertas características de la HA comercial como son el ratio molar, la estequiometría, la distribución del tamaño de partícula o la superficie específica, realizando los análisis pertinentes, es necesario conocer también los procedimientos llevados a cabo para la síntesis del material, o la temperatura de calcinación en caso de que haya sido sometido a un tratamiento térmico previo. Pero en ocasiones, no resulta fácil acceder a este tipo de información, ya que se trata de materiales comerciales en lo que el procedimiento seguido para su fabricación no se especifica por

la empresa productora. Los diferentes autores atribuyen las diferencias en la densificación, en las propiedades mecánicas, o incluso en los cambios de color de las muestras para una misma temperatura de sinterización, a la presencia de impurezas como por ejemplo Mn^{5+} o MnO^{3-} ; o bien, a las diferencias en la composición química (relación molar Ca/P) del polvo y a las características del mismo, como el tamaño de partícula o la superficie específica. Se consiguen mayores densidades cuanto mayor es el área superficial y menor es el tamaño de partícula del polvo de partida. Concretamente, la velocidad de sinterización de un determinado polvo a una temperatura dada es inversamente proporcional al cuadrado del tamaño de la partícula del polvo (367,374). A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos en la densificación del material con respecto al tamaño de partícula y al área superficial del polvo de partida en el que se han confeccionado las piezas para obtener el granulado denso.

3.1.1.1.3- Método de obtención de HA de elevada densidad en la presente tesis doctoral

Para comprobar la pureza de la HA en cada síntesis, y observar que su presencia fue superior al 95% con ausencia de fases secundarias, se realizó un análisis de difracción de rayos X del polvo de cada síntesis sometido 1000 °C manteniendo dicha temperatura durante 2 horas, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min y de enfriamiento de 20 °C/min. Una vez comprobada la presencia de hidroxiapatita con la ficha JCPDS N° 89.6437 según las bases de datos del ICDD, se ha medido el área del pico a 31.8° para comprobar su pureza. Una temperatura de 1000 °C es lo suficientemente elevada para obtener un material de marcada cristalinidad, pero sin resultar tan alta para que se puedan producir fases secundarias o degradación del material. El difractograma obtenido se muestra en la Fig. 3.5, en el que se observan además los difractogramas del polvo de hidroxiapatita calcinado a diferentes temperaturas.

Con el fin de obtener piezas con una densidad $\geq 97\%$ de la densidad real de la HA, se ha optado por la calcinación previa del material a diferentes temperaturas, de este modo se modifica el gel obtenido para que adquiera las propiedades adecuadas que permitan su posterior procesado. Para ello, una vez obtenido el gel amorfo y tras secarlo a 100 °C, se calcinó el polvo a las temperaturas de 750 °C, 800 °C, 850 °C y 1000 °C, siguiendo una rampa de calentamiento de 10 °C/ min hasta alcanzar dichas temperaturas mencionadas, con una meseta de 120 minutos en todos los casos y una rampa de enfriamiento de 20 °C/min, tal y como se muestra en la Fig. 3.4.

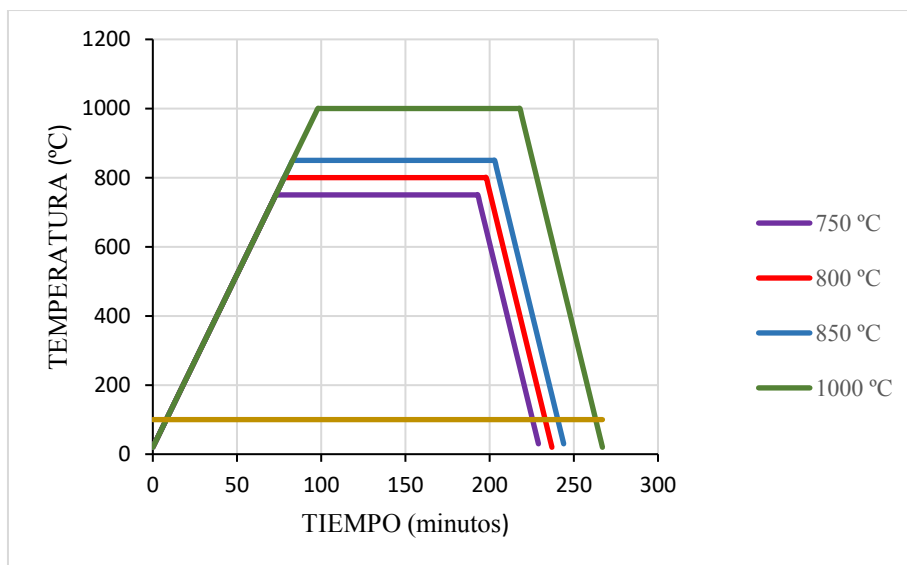


Fig. 3.4: Gráfica en la que se observan las rampas de calcinado seguidas para obtener el polvo de HA, a 750 °C, 800 °C, 850 °C y 1000 °C (10 °C/min hasta alcanzar la temperatura deseada, que se mantuvo durante 120 minutos, y una rampa de enfriamiento de 20 °C/min hasta la temperatura ambiente). En el caso del **GEL SECO** corresponde al gel sometido únicamente a 100 °C en una estufa y enfriado a temperatura ambiente, sin ser sometido a tratamiento térmico en el horno.

3.1.1.1.3.1- Influencia de la temperatura de calcinación del polvo de HA en la estructura

Una vez que el material ha sido calcinado a las diferentes temperaturas, se procedió a molerlo en el molino de ágata durante 60 minutos y a tamizarlo en un tamiz con luz de 63 μm . A estos polvos se les ha realizado un análisis de difracción de rayos X, cuyos resultados se exponen en la Fig. 3.5.

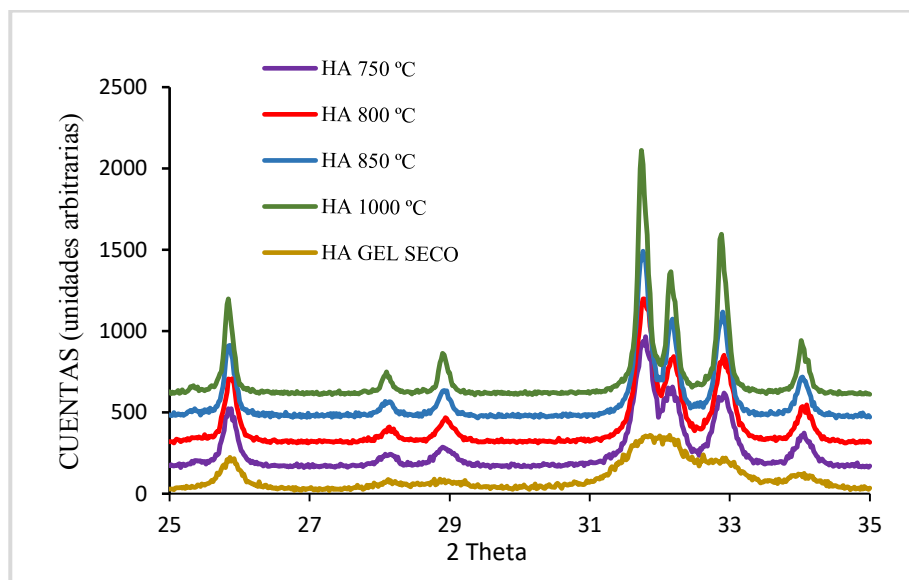


Fig. 3.5: Gráfica en la que se muestran los difractogramas obtenidos de los polvos calcinados a las temperaturas de 750 °C, 800 °C, 850 °C y 1000 °C.

En los trabajos publicados por Ramesh et al. (2012) (361) y por Gibson et al. (2001) (363), se indica que el polvo de gel seco tiene una pobre cristalización, sobre todo cuando es sintetizado por vía húmeda, mostrando picos de difracción anchos. Los resultados obtenidos en la presente tesis coinciden con dicha aseveración, pues en el difractograma mostrado en la Fig. 3.5, en el caso del GEL SECO, se aprecian unos picos pobremente cristalinos, siendo el pico mayor el situado a 32°; correspondiendo con hidroxapatita calcio deficiente (CDHA), con la ficha JCPDS N° 09.0432 según las bases de datos del

ICDD, en la que sus picos característicos se representan a 26.1° y entre 30 y 32° . Patel et al. (2001) (375) indicaron a raíz de los resultados obtenidos en su trabajo, que los calcinados entre 400 y 700°C producían difractogramas similares al material crudo. En el presente trabajo, para el calcinado de 750°C , ya se pueden observar los picos característicos de HA. Probablemente esta no sea una temperatura lo suficientemente elevada para ratificar que hay HA de elevada pureza en la síntesis, pues pueden aparecer fases secundarias a temperaturas superiores. En la Fig. 3.5, también se observa cómo los picos característicos de HA se estrechan y aumentan a medida que se incrementa la temperatura de calcinación. Este hecho indica que el grado de cristalización aumenta de forma proporcional a la temperatura de calcinación.

3.1.1.1.3.2- Influencia de la temperatura de calcinación en el diámetro medio y en la superficie específica del polvo de HA

A los polvos calcinados a diferentes temperaturas, se les han realizado los análisis para determinar su tamaño medio de partícula y su superficie específica. Los resultados obtenidos con la realización de estos análisis se muestran en la Tabla 3.1 y en la Fig. 3.6

Tabla 3.1: Resultados del diámetro medio y el área de superficie de los polvos de HA en forma de gel seco, y calcinados a 750 , 800 , 850 y 1000°C .

TEMPERATURA DE CALCINADO ($^\circ\text{C}$)	DIÁMETRO MEDIO DE PARTÍCULA (μm)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m^2/g)
GEL SECO (100)	3.19	59.18
750	0.46	29.04
800	1.05	25.53
850	1.48	17.89
1000	13.25	6.35

En lo que respecta al tamaño medio de grano, Juang et al. (1996) (376), obtuvieron un incremento del tamaño de partícula directamente proporcional a la temperatura de sinterizado (Tabla 3.2), atribuyendo este hecho a la unión de los cristales por fuerzas de Van der Waals a causa del inicio del proceso de sinterizado. De este modo, lo que realmente se mide es el tamaño del aglomerado de partículas formado en el sinterizado. Para la preparación de las disoluciones en el presente trabajo de investigación, se ha procedido a someterlas a ultrasonidos durante 5 minutos para evitar la presencia de dichos aglomerados. Se obtuvieron valores inferiores de diámetro medio de partícula para los calcinados de 750, 800 y 850 °C, similares al del polvo de GEL SECO, en concordancia con lo que indica Gibson et al. (2001) (363). En el caso del polvo de 1000 °C, en este trabajo se obtuvo un valor de diámetro medio de partícula muy elevado. Para el GEL SECO, el valor obtenido (3.19 μm) es superior a los referidos por Juang et al. (1996) (376) y por Ramesh et al. (2012) (361), que fueron del orden de 0.97 μm para el primero, y de 1.78 μm para el segundo, quién indica que oscilaron entre 1 y 3 μm , lo que concuerda con el resultado obtenido en el presente trabajo. Dado que la hidroxiapatita es soluble, y dicha solubilidad es inversamente proporcional a la temperatura de calcinado, se considera que el valor obtenido para el gel seco es aproximado.

Sin embargo, Patel et al. (2001), mostraron valores de diámetro medio de partícula muy elevados para los polvos, tanto en crudo como los que habían sido calcinados, los cuales oscilaron entre 25 y 27 μm , con una distribución de entre 3 y 67 μm ; tal y como se observa en la Tabla 3.2. Por otra parte, indicaron que el tamaño medio de partícula disminuía a medida que se incrementaba la temperatura de calcinado, aunque no lo hizo de forma significativa. A pesar de estas diferencias en los resultados, el tratamiento de los polvos en su investigación fue similar al de este trabajo, con el secado del material a 80 °C durante una noche, molienda en mortero y molino de bolas de porcelana mezcladas con alúmina durante 1 hora en seco, y tamizado en tamiz con luz de 75 μm . Sería necesario evaluar otras variables para poder determinar la causa de estas diferencias.

Tabla 3.2: Tabla en la que se muestran y comparan los resultados obtenidos en los trabajos de Juang et al. (1996) (376) y Patel et al. (2001) (375), los cuales han sido descritos con anterioridad.

TRATAMIENTO TÉRMICO (°C)	DIÁMETRO MEDIO DE PARTÍCULA (μm)	
	<i>Juang et al. (1996)</i>	<i>Patel et al. (2001)</i>
GEL SECO (100)	0.97	26.8
700	1.09	27
800	2.47	26.3
900	3.01	25.9
1000	4.19	25

Tanto Juang et al. (1996), como Gibson et al. (2001) y Ramesh et al. (2012), coinciden en que la distribución del tamaño medio de partícula es bimodal cuando el material de HA está sin calcinar, es decir en crudo o en forma de gel seco, con valores que van desde 2 μm hasta 30 μm (361,363,376). Juang et al. (1996), indica que el calcinado modifica esta distribución, pasando dicha distribución a monomodal cuando el polvo es sometido a un tratamiento térmico. En la Fig. 3.6 se exponen los resultados de la distribución del tamaño medio de partícula obtenidos en la presente tesis doctoral. En la misma se observa, en concordancia con lo citado por los autores anteriores, que el polvo de GEL SECO presenta una distribución bimodal, y el polvo calcinado a 1000 °C monomodal. Para los polvos calcinados a 750 °C, 800 °C y 850 °C las curvas no siguen un patrón claramente definido, encontrándose estos en una posición intermedia.

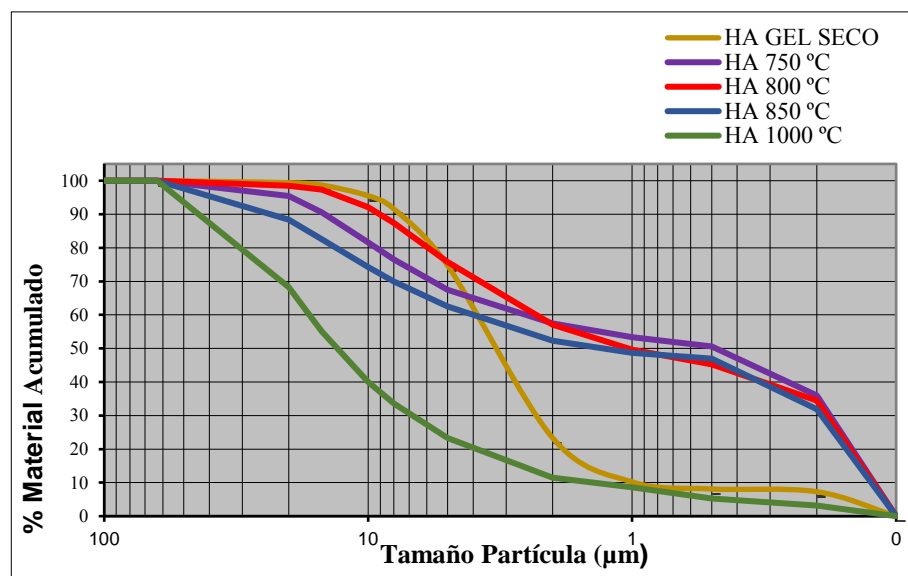


Fig. 3.6: Gráfico en el que se muestran los resultados obtenidos con el sistema Sedigraph de diámetro medio de partícula. Se puede ver como el $d_{0.9}$ es muy similar para el GEL SECO y los polvos calcinados a 750 y 800 y 850 °C, encontrándose por debajo de 20 µm. El $d_{0.9}$ del polvo calcinado a 1000°C se encuentra por debajo de 40 µm. El valor de $d_{0.5}$, varía fundamentalmente para el gel seco (3.19 µm) y el polvo calcinado a 1000 °C (13.25 µm), siendo menores las diferencias entre los valores para los calcinados de 750, 800 y 850 °C entre sí (0.46 µm, 1.05 µm y 1.48 µm respectivamente).

En lo que respecta a la superficie específica, tal y como se observa en la Tabla 3.1, esta disminuye a medida que aumenta la temperatura de calcinado. Para el GEL SECO, el valor de área de superficie es muy elevado (59.18 m²/g), resultado que concuerda con lo obtenido por Ramesh et al. (2012) y Boilet et al. (2013), que fue de 60.7 y 60 m²/g respectivamente. Patel et al. (2001), refirió valores mucho más elevados, tanto para el gel seco (85 m²/g), como para el polvo que había sido calcinado a 700 °C (57 m²/g). Sin embargo, el resultado del polvo calcinado a 800 °C (25 m²/g) fue similar al obtenido en esta investigación (25.53 m²/g). Boilet et al. (2013) también refirieron valores muy similares para la HA calcinada a 800°C (23 m²/g). Los resultados para el polvo sometido a una temperatura de 1000 °C concuerdan con lo referido en investigaciones anteriores (7 m²/g para

Patel et al. (2001) frente a $6.39 \text{ m}^2/\text{g}$ para el polvo que se ha calcinado a dicha temperatura en este trabajo) (361,370,375).

3.1.1.1.3.3- Fabricación del granulado denso de HA

La confección de las piezas densas se ha realizado empleando 6 g de polvo calcinado a las temperaturas antes mencionadas (750, 800, 850 y 1000°C) e introduciéndolo en un globo con ayuda de un embudo. Una vez compactado manualmente el material de forma que adquirió forma de óvalo, se introdujo en la prensa isostática y se sometió a 3000 kg/cm^2 . De este modo se obtuvo una pieza compacta en crudo con la morfología que se muestra en la Fig. 3.7. Como se ha especificado, algunos autores realizan prensado uniaxial previo al prensado isostático, pero se ha considerado que existe un mayor riesgo de que se produzcan grietas en la pieza en sentido horizontal a causa del prensado uniaxial, que posteriormente no puedan ser solventadas con el prensado isostático y la sinterización.



Fig. 3.7: Imagen de la pieza prensada, a la izquierda en el interior del globo y, a la derecha, tras el prensado previo a la sinterización.

En el momento en que se ha obtenido una pieza prensada, se introduce en el horno en un crisol para proceder a su sinterizado. Como se ha mencionado, la temperatura que se ha empleado es de 1200°C , con una meseta de permanencia de 2 horas, siguiendo la rampa de sinterizado que se muestra en la Fig. 3.8. Como se observa en el

difractograma representado en la Fig. 3.2, a esta temperatura se obtuvo HA de elevada pureza, así como una densidad aparente de la pieza superior al 97 % del valor de densidad real.

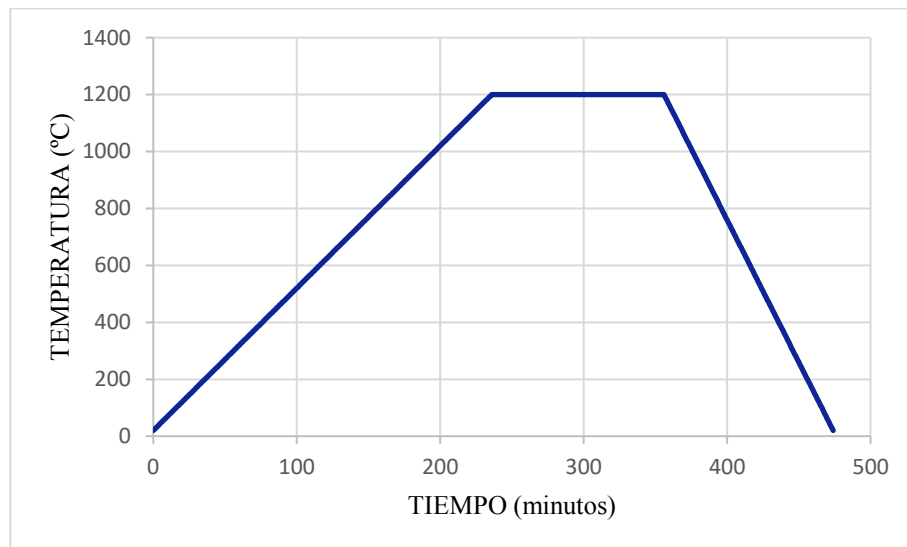


Fig.3.8: Gráfica de la rampa de sinterización empleada para obtener piezas densas de HA. Se ha seguido una rampa de calentamiento lenta, de 5 °C/min, de este modo se evita que se formen grietas y se favorece la densificación uniforme. Posteriormente se ha mantenido la temperatura de sinterizado a 1200 °C durante 2 horas; y finalmente, se ha seguido una rampa de enfriamiento de 10 °C/min. El ciclo de sinterización tuvo una duración total de 474 minutos.

Tras el sinterizado de las piezas confeccionadas con los diferentes polvos, se les midió la densidad aparente siguiendo el método de Arquímedes y con el equipo Accupyc® de Micromeritics. Los resultados obtenidos y la comparativa de los mismos se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Tabla en la que se muestran los resultados de las densidades de las piezas prensadas isostáticamente y sinterizadas a 1200 °C. Aunque todas ellas presentan densidades aparentes muy elevadas, aquellas confeccionadas con el polvo de 800 °C mostraron los resultados más altos.

Tª DE CALCINADO DEL POVO (°C)	DENSIDAD APARENTE (g/cm ³)	PORCENTAJE DE LA DENSIDAD REAL (3.14 g/cm ³)
GEL SECO	2.75	88.53 %
750	3.07	97.77 %
800	3.11	99.04 %
850	3.07	97.77 %
1000	2.94	93.63 %

A partir de estos resultados, para obtener el granulado denso, se decidió emplear piezas densas de HA obtenidas con prensado isostático a 3000 kg/cm² del polvo calcinado a 800 °C, y sinterizadas a 1200 °C durante 2 horas. La superficie de fractura de dichas piezas se muestra en las Fig. 3.9. El hecho de obtener mayores densidades aparentes con los polvos calcinados a 800 °C se atribuye a que el pretratamiento térmico a esta temperatura inhibe el crecimiento de grano posterior a la contracción durante su sinterización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Juang et al (1996) (376), quién indicó que el crecimiento de grano es menos posible en polvos calcinados a 800 o 900 °C. Sin embargo, este autor también determinó que son necesarias temperaturas mayores para alcanzar el sinterizado completo y una elevada densidad cuando se emplea polvo calcinado. A mayor temperatura de calcinado, es necesaria mayor temperatura de sinterizado. En la presente investigación, se han alcanzado densidades más elevadas con los polvos calcinados a 750, 800 y 850 °C, que con el gel seco para la misma temperatura de sinterización de 1200 °C, con la cual se evita la presencia de fases secundarias o la degradación de la hidroxiapatita. En cambio, para el polvo de 1000 °C, la densidad para la misma temperatura decrece considerablemente, seguramente debido

al inicio del sinterizado o a un comienzo del crecimiento de grano con el calcinado a dicha temperatura.

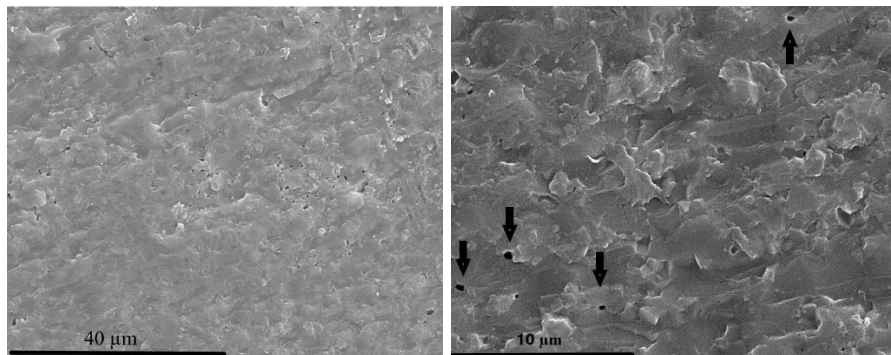


Fig. 3.9: Imágenes de dos zonas de la superficie de fractura de una pieza de HA densa. Se observa que las muestras apenas presentan porosidad, los poros que hay son de pequeño tamaño (menor a 1 μm) y aislados (indicados con la imagen de una flecha). Al moler dichas piezas para obtener el granulado, estas romperán por esas zonas con poros obteniendo así densidades muy próximas a la real en el granulado que se implantó en los conejos New Zealand.

En el trabajo de Tampieri et al. (1997) (360), las piezas obtenidas mediante sinterización a temperatura elevada, tuvieron una presencia de poros superior que en las muestras obtenidas en la presente investigación. Además, sus muestras fueron sinterizadas a temperaturas elevadas (de 1220, 1260 y 1300 $^{\circ}\text{C}$) tras ser sometidas a prensado isostático, por lo que presentaron fases secundarias de α y β -TCP. La porosidad que contienen las muestras fabricadas en el trabajo de Tampieri et al. (1997) puede atribuirse su fabricación a partir de material en crudo, es decir, sin calcinado previo; circunstancia que concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Las imágenes de la superficie de fractura que representa la elevada densidad obtenida en las piezas confeccionadas en la presente tesis doctoral con el polvo de HA precalcinado a 800 $^{\circ}\text{C}$, recuerda a las imágenes de las piezas prensadas mediante HIP, mostradas en los artículos de Boilet et al. (2013) y Descamps et al. (2013) (370,373) (Fig. 3.3).

Para conseguir finalmente un granulado entre 250 μm y 1 mm, con el mismo tamaño partículas que los biomateriales comerciales empleados (Bio-Oss® y KeraOs®), cuya caracterización fue expuesta en la sección 2.1.1. de Material y Métodos, se rompieron en primer lugar las piezas densas con ayuda de un mortero. Tras desechar el polvo de tamaño inferior a 250 μm , se introdujeron los gránulos obtenidos en un molino de bolas de alúmina, para redondear los bordes cortantes de los granos y continuar con la molienda hasta obtener el tamaño de los gránulos deseado. El tiempo total de la molienda fue de 21 horas, en intervalos de entre 2 y 5 horas, entre los que se desechó el material que se había convertido en polvo (con tamaño por debajo de 250 μm). Finalmente, se obtuvo un granulado entre 250 y 1000 μm , del cual el 17.3% presentó un tamaño entre 710 y 1000 μm , y el 82.7% restante entre 250 y 710 μm (Fig. 3.10). El rendimiento de la molienda fue de un 55.03%.



Fig. 3.10: Imágenes de microscopía óptica en las que se muestra el granulado de hidroxiapatita denso fabricado en el presente trabajo de investigación. En la imagen de la izquierda, se observa el granulado que presenta un tamaño entre 250 y 1000 μm . En la imagen de la derecha se muestra la morfología de un grano en detalle, sin presencia de porosidad.

Se realizó a la caracterización final del granulado obtenido, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.4. La pureza de la HA del granulado tras el sinterizado a 1200 $^{\circ}\text{C}$ se muestra en el difractograma de la Fig. 3.2 anteriormente citado, la superficie específica se midió siguiendo el método BET, la porosidad del granulado con el sistema

Accupyc de Micromeritics® (obteniendo la densidad aparente de los gránulos, muy próxima a la densidad real), y la comprobación de las fracciones del tamaño del granulado entre 250 y 1000 μm , se detalló en el proceso de molienda de las piezas densas.

Tabla 3.4: Resultados de la caracterización del granulado de HA denso.

	PUREZA (%)	TAMAÑO DE GRANULADO (mm)	POROSIDAD (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m^2/g)
GRANULADO HA DENSO	≥ 99	0.25-1	0.6 ± 0.3	0.01

Para evitar la contaminación por carbono derivada de la manipulación del material, se ha calcinado el granulado a 900 °C durante 2 horas. Se ha seguido una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta alcanzar los 900 °C, los cuales se mantuvieron durante 120 minutos, y una rampa de enfriamiento de 10 °C/min hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, sin manipular el material manualmente, se envasó en recipientes de plástico resistente a la radiación gamma, con una cantidad aproximada de 1 g de material en cada uno, manteniendo las proporciones mencionadas del tamaño de los granos. Finalmente, se procedió a su esterilización mediante radiación gamma. De este modo, el material está listo para ser empleado en la cirugía manteniendo las condiciones de asepsia adecuadas (Fig. 3.11).



Fig. 3.11: Material granulado denso de hidroxiapatita envasado individualmente, para su empleo en una cirugía y así conservar la esterilización de los recipientes restantes, pudiendo ser empleados posteriormente.

3.1.1.2- β -fosfato tricálcico

3.1.1.2.1- Influencia de la temperatura y tiempo de sinterización en la densificación del β -TCP

El proceso de sinterización del β -fosfato tricálcico está menos documentado que el de la hidroxiapatita. Como ya se ha mencionado en la introducción, existen dos variedades cristalinas con aplicaciones biomédicas, α -TCP y β -TCP. El β -TCP es la forma termodinámicamente estable a baja temperatura; su densidad real es 3.07 g/cm^3 y se transforma en α -TCP a temperaturas que oscilan entre 1120 y 1170°C (365). Para Descamps et al. (2007), el β -TCP es estable por debajo de 1120°C , el α -TCP permanece estable entre 1120 y 1470°C y el α' -TCP se obtiene por encima de los 1470°C (377). Oliveira et al. (2012), coincide en que la transformación de β a α -TCP

se produce a 1125 °C (378). En cambio, Ghosh et Sakar (2016), obtienen α -TCP a temperaturas superiores a 1300 °C, y el valor de densidad real del β -TCP que refieren es de 3.14 g/cm³ (379). El α -TCP, con una densidad real de 2.86 g/cm³, es menos empleado en implantes cerámicos sinterizados debido a sus propiedades de hidrólisis, por tanto, la transformación de β -TCP en α -TCP es un fenómeno generalmente no deseado en la síntesis de sustitutos óseos. Por ello, en la presente tesis doctoral, se ha empleado β -TCP de elevada pureza ($\geq 95\%$) para realizar las piezas densas, con la misma composición química que el material comercial también empleado (KeraOs®), y por el hecho de que posee mejores propiedades mecánicas, pues en la transformación de β -TCP a α -TCP se produce una expansión dilatométrica que produce estrés mecánico provocando grietas en la pieza. Con el posterior enfriamiento de la muestra a temperatura ambiente, no se produce una transformación inversa de α a β -TCP, permaneciendo el α -TCP en la pieza fabricada.

Es, por tanto, la transformación de β a α -TCP un factor que determina la elección de la temperatura de sinterizado. En el presente trabajo de investigación, se han probado diferentes temperaturas para la sinterización de las piezas de elevada densidad que se pretendían confeccionar; concretamente 1100, 1125, 1150, 1175 y 1200 °C. Finalmente, se ha empleado la temperatura de sinterizado a 1125 °C, pues a pesar de que la transformación a α -TCP se ha producido en aquellas piezas que han sido sometidas a 1200 °C, tal y como se puede observar en la Fig. 3.12, no se ha observado un incremento en la densidad aparente de las piezas que han sido sinterizadas a temperaturas de 1150 y 1175 °C, a pesar de no apreciarse α -TCP en las mismas. Estos resultados, coinciden con los referidos por Tampieri et al. (1997), quién observó la presencia de α -TCP a partir de los 1200 °C (360). Las variaciones tan sustanciales en la temperatura de transformación de β a α -TCP, y en definitiva, en el comportamiento durante el sinterizado, son ocasionadas por pequeñas variaciones en la proporción Ca/P (378).

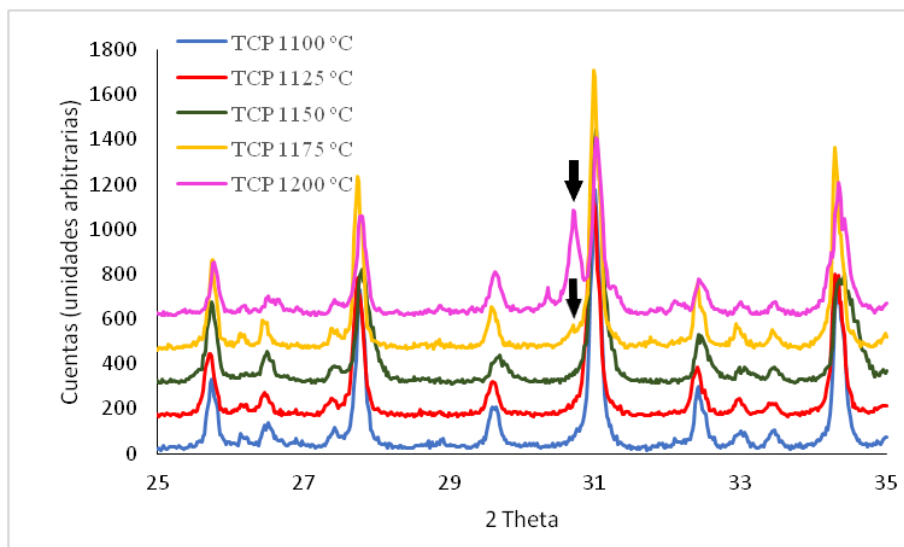


Figura 3.12: Difractogramas de los sinterizados de β -TCP a 1100, 1125, 1150, 1175 y 1200 °C. Como se señala en la figura (flecha), a 1175°C se puede observar un leve pico que indica el comienzo de la transformación de β -TCP a α -TCP; pero es a la temperatura de 1200 °C en la que se observa que se produjo una clara transformación a α -TCP. En el difractograma de 1150 °C se observa cómo los picos disminuyen en altura y se ensanchan, lo que puede indicar una reducción de la cristalinización del β -TCP, que puede ser debido a un comienzo en la degradación o de la transformación del β -TCP. A las temperaturas de 1100 y 1125 °C hay una elevada cristalinización del material que se aprecia en la altura y estrechez de los picos.

Durante el proceso de sinterización, entre 300 y 400 °C se produce una pérdida de agua del material en crudo y de los restos de nitrato amónico. Este hecho supone una pérdida de peso importante, de aproximadamente el 26%. La densificación comienza a los 750 °C, a esta temperatura se produce una pérdida del peso de aproximadamente el 1.5%, lo que indica la eliminación de H₂O a consecuencia de la reacción entre HA y DCP y de la conversión de hidroxapatita calcio-deficiente (CDHA) a β -TCP. Según Ghosh et Sakar (2016), los picos característicos de β -TCP sintetizado por vía húmeda, se pueden determinar a través de DRX cuando el material es sometido a una temperatura de 700 °C. A temperaturas inferiores, los picos obtenidos en el difractograma se corresponden con CDHA (379). La sinterización

máxima y la cristalización del β -TCP se alcanza entre 950 – 1000 °C y la pérdida de peso a esta temperatura es del 2.8%. Hasta este momento, el incremento en las propiedades mecánicas y en la densidad es proporcional al aumento de la temperatura. Pero en esta última etapa del sinterizado, tiene lugar el crecimiento de grano, y corresponde al momento en el que la densidad aparente se encuentra aproximadamente entre el 93 y el 95%, muy próxima a la densidad real (362,365). Este hecho, junto con la posterior formación de α -TCP, produce que la densidad aparente alcance su límite, así como que las propiedades mecánicas decrezcan. Según Descamps et al. (2007), si la relación Ca/P es ligeramente inferior a 1.5, la densificación comienza a los 880 °C y alcanza su máxima contracción a 1050 °C (377).

No obstante, Ghosh et Sakar (2016) consideraron que con el aumento de la temperatura se produce un incremento del tamaño de grano que conlleva a la obtención de densidades aparentes elevadas en las piezas sinterizadas. Determinaron que dicho crecimiento favorece la eliminación de la porosidad interconectada, permaneciendo poros escasos, los cuales se encuentran aislados (379). Es cierto que el tamaño de grano reduce la porosidad interconectada y conlleva a la formación de poros aislados, pero lo deseable es que se produzca en la etapa final de sinterizado una contracción que elimine la porosidad, de lo contrario, únicamente con el crecimiento de grano, no se obtendrían densidades por encima del 93%. El tamaño deseado de los granos del β -TCP sinterizado que los autores consideran ideal para obtener densidades elevadas no debe superar 1 y/o 2 μm , y es recomendable que su distribución sea bimodal (360,365,379).

En lo que al proceso de sinterización se refiere, además de la temperatura, para obtener piezas con densidad muy próxima a la densidad real, también intervienen factores como la velocidad de calentamiento y enfriamiento de las muestras, así como el tiempo de permanencia a la temperatura de sinterizado. Para evitar generar tensiones térmicas en la muestra, la velocidad de calentamiento y enfriamiento de las muestras no debe ser muy rápida. En el caso del β -TCP, dicha velocidad puede ser de 5 o 10 °C/min sin perjuicio de la densificación de las piezas densas (380). En esta ocasión, se ha llevado

a cabo el sinterizado mediante una velocidad de calentamiento de 5 °C/min y una velocidad de enfriamiento de 10 °C/min. Con respecto al tiempo de permanencia, Yoshida et al. (2007), obtuvieron incrementos en la densidad y en la resistencia a la flexión de piezas de β -TCP sinterizadas durante 48 horas a 1100 °C, con respecto a aquellas que habían sido sinterizadas durante 24 horas (381). Estos tiempos de sinterización son muy elevados y producirían gastos adicionales innecesarios en la fabricación del granulado, generalmente se trabaja con tiempos de permanencia de entre 2 y 3 horas. En el presente trabajo de investigación se han probado tiempos de permanencia de 2, 3 y 6 horas. Se han observado leves incrementos en los valores de densidad aparente de las piezas sinterizadas durante 3 horas con respecto a 2 horas. Pero no se han observado mejoras sustanciales en aquellas piezas sinterizadas durante 6 horas, lo que conlleva a un gasto de recursos innecesario. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Descamps et al. (2007), quién obtuvo piezas coladas con densidades del 97% tras sinterizarlas a 1100 °C durante 3 horas (377).

3.1.1.2.2- Métodos de procesamiento citados en la literatura para incrementar la densificación del β -TCP

Para conseguir piezas totalmente densas, sin presencia de α -TCP ni crecimiento excesivo de grano, los diferentes autores emplearon métodos como el Hot-Press (HP), el Spark-Plasma Sintering (SPS), Gel-Casting y el sinterizado por microondas. De este modo, lograron un elevado empaquetamiento de granos, sin presencia de porosidad y un tamaño de grano entre 1 y 2 μ m con temperaturas de sinterizado inferiores a la temperatura de transformación de β a α -TCP (entre 1050 y 1150 °C, e incluso a 880 °C) (370,382–384).

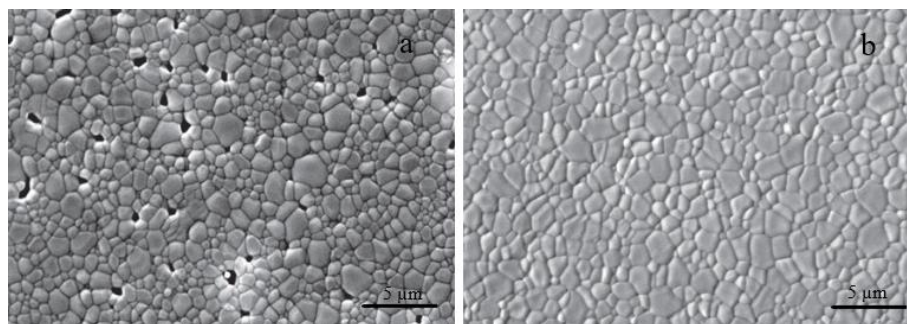


Fig. 3.13: Imágenes que representan una pieza colada de β -TCP, (a) sinterizada a 1050 °C y (b) la misma pieza tras ser sometida a HIP. Imágenes adaptadas de (370) con Licencia Creative Commons Atribución 2.0 Genérica (CC BY 2.0).

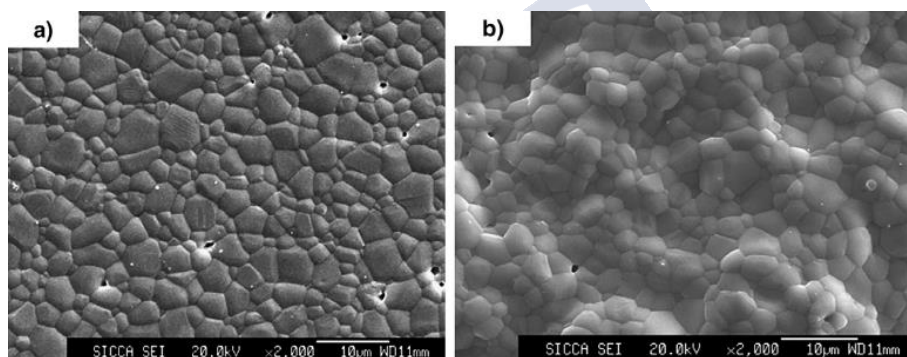


Fig. 3.14: Fotografías tomadas con microscopía electrónica que representan (a) una superficie pulida y (b) una superficie de fractura de una pieza de β -TCP obtenida mediante Gel-casting. Tomada de (384), con permiso de Elsevier, N° de licencia 4427191015440.

El empleo de aditivos, en cambio, no ha reportado resultados tan satisfactorios. Algunos autores han probado a emplear aditivos como MgO, ZnO, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ para poder aumentar el límite de temperatura del sinterizado del β -TCP (entre 1120 y 1180 °C), y de este modo obtener piezas de elevada densidad (385–387). Pero el empleo de estos dopantes produce alteraciones en la composición Ca/P del β -TCP y en la pureza del material. Ryu et al. (2002) afirmaron, a partir de sus resultados empleando el dopaje del β -TCP con $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, que la transformación a α -TCP se produce a una temperatura mayor de 1200 °C, pero este

produce un efecto perjudicial sobre las propiedades mecánicas del β -TCP, debido a que favorece el crecimiento de grano, facilitando la formación de grietas (386).

Otra alternativa estudiada para obtener piezas de β -TCP totalmente densas, es emplear polvo de este material con partículas de tamaño nanométricas, pues su capacidad de sinterizado es superior a la del polvo con tamaño de micras, obteniéndose piezas densas a menor temperatura. Por otra parte, la degradabilidad de las piezas obtenidas con polvo de partida de tamaño nanométrico es menor (388).

Algunas técnicas empleadas para conseguir densificar cerámicas que contienen β -TCP en su composición son: añadir una pausa durante el enfriamiento de la muestra a una temperatura por debajo de la que se produce la transición de β a α -TCP para favorecer la conversión inversa. Pero como se ha mencionado, existe un deterioro de las propiedades mecánicas de las piezas derivadas de la transformación que no revierte aunque ya no esté presente el α -TCP. Por otra parte, también se ha probado el sinterizado en dos pasos. Es necesario mencionar que la mayor parte de estas técnicas han sido estudiadas empleando fosfatos cálcicos bifásicos o hidroxiapatita, sin determinar claramente su comportamiento en β -TCP (389,390).

Son diversos los factores que influyen en la capacidad de sinterización y de densificación del β -TCP. Además del tiempo y temperatura de sinterización, así como la velocidad de calentamiento y de enfriamiento durante el proceso, interviene el método que se ha seguido para sintetizar el material y el posterior tratamiento del mismo. Estos factores determinan las características del polvo con el que se confeccionarán las piezas. Dichas características son la distribución granulométrica del polvo y la superficie específica del mismo. En la presente tesis doctoral, como ya se ha mencionado, se ha elegido la vía húmeda para obtener β -TCP de elevada pureza. Anteriormente, se ha reportado que se trata del método con el que se obtienen piezas de mayor densidad y microdureza Vickers, cuando se comparan con piezas confeccionadas con material de β -TCP sintetizado por el método sol-gel o a través de la síntesis de combustión de solución (379).

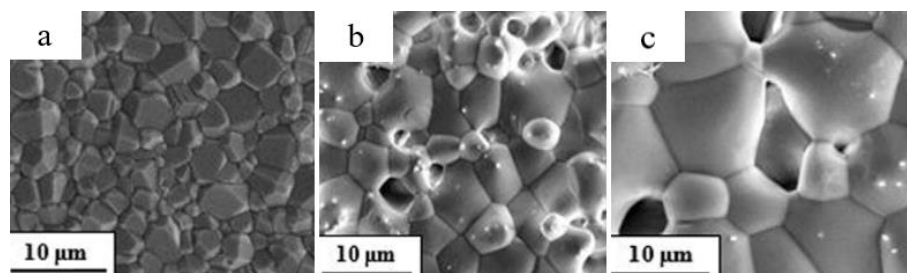


Fig. 3.15: Imágenes de piezas realizadas a partir de prensado hidráulico y sinterizadas a 1200 °C. En la imagen (a) la síntesis de β -TCP se realizó mediante precipitación química húmeda, en la imagen (b) siguiendo el método sol-gel y en la imagen (c) a partir de una síntesis mediante solución de combustión. Se observa que, bajo las mismas condiciones de procesado, la muestra más densa es la obtenida a partir de polvo de β -TCP obtenido mediante la vía húmeda. Adaptada de (379), con permiso de Elsevier, N° de licencia 4450121237463.

No existe consenso acerca de si el sometimiento del polvo de β -TCP a un tratamiento térmico o calcinación previos a la sinterización, conllevan a un incremento de la densidad o de las propiedades mecánicas obtenidas tras la misma. Se considera que factores como la superficie específica y el tamaño de partícula del polvo con el que se realizan las piezas intervienen directamente en la optimización del sinterizado. Estas características de superficie específica y tamaño de partícula pueden ser modificadas siguiendo un calcinado del gel seco obtenido en la síntesis. Mehdikhani et Boharni (2014) afirman que el gel obtenido a partir de la síntesis vía húmeda necesita ser calcinado para obtener realmente β -TCP. Estos autores prensaron isostáticamente a 50 MPa polvo de β -TCP sintetizado por vía húmeda y calcinado a 700 °C previamente. A continuación, sinterizaron las piezas obtenidas a temperaturas de 800, 900, 1000 y 1100 °C. En sus resultados observaron cómo la densidad, la dureza y la contracción aumentaban a medida que incrementaba la temperatura de sinterización, alcanzando su máximo a 1100 °C. La densidad aparente alcanzada en sus piezas fue del 93.66% de la densidad real (391).

3.1.1.2.3- Método de obtención de β -TCP de elevada densidad en la presente tesis doctoral

Para comprobar la pureza del β -TCP en cada síntesis, y observar que esta fue superior al 95% con ausencia de fases secundarias, se realizó un análisis de difracción de rayos X de cada síntesis a 1000 °C durante 2 horas, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min y de enfriamiento de 20 °C/min. Una vez comprobada la presencia de β -TCP con la ficha JCPDS N° 09.0169 según las bases de datos del ICDD, se ha medido el área del pico a 31.038° para comprobar el porcentaje concreto de β -TCP presente en el polvo sintetizado. Una temperatura de 1000 °C es considerada lo suficientemente elevada para obtener un material de marcada cristalinidad, pero sin resultar demasiado elevada de modo que se produzca la transformación a α -TCP. Las fases secundarias que se buscan generalmente tras la síntesis de β -TCP son el C₂P (ficha JCPDS N° 09.0346 según las bases de datos del ICDD) y la hidroxiapatita (ficha JCPDS N° 89.6437 según las bases de datos del ICDD), no pudiendo coincidir ambas fases simultáneamente. El difractograma obtenido se muestra en la Fig. 3.16, en la que se observan además los difractogramas de β -TCP calcinado a diferentes temperaturas.

La mayor parte de las investigaciones comparan diferentes temperaturas de sinterizado para obtener las propiedades deseadas. En esta ocasión, con el fin de obtener piezas con una densidad muy próxima a la real ($\geq 97\%$), al igual que con el material de hidroxiapatita, se ha optado por realizar la calcinación previa del material a diferentes temperaturas, siguiendo lo mencionado por Mehdikhani et Boharni (2014), pero probando diferentes temperaturas ya que se pretendía alcanzar densidades aparentes mayores que las referidas por estos autores. Con el calcinado del gel seco se buscó que el polvo adquiriese las propiedades adecuadas para su posterior procesado. Son escasos los estudios previos que emplean un precalcinado del material de β -TCP para su posterior procesado y sinterización, y todavía menor el número de investigaciones en las que comparan diferentes temperaturas de calcinación. Por ello, en esta investigación se ha querido comprar la

influencia de un pretratamiento térmico en la capacidad de densificación de una muestra durante el posterior sinterizado. Para ello, una vez obtenido el gel amorfo y secarlo a 100 °C, se calcinó el polvo a las temperaturas de 750 °C, 800 °C, 850 °C y 1000 °C, siguiendo una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta alcanzar dichas temperaturas mencionadas, con una meseta de 120 minutos en todos los casos y una rampa de enfriamiento de 20 °C/min, tal y como se muestra en la Fig. 3.15.

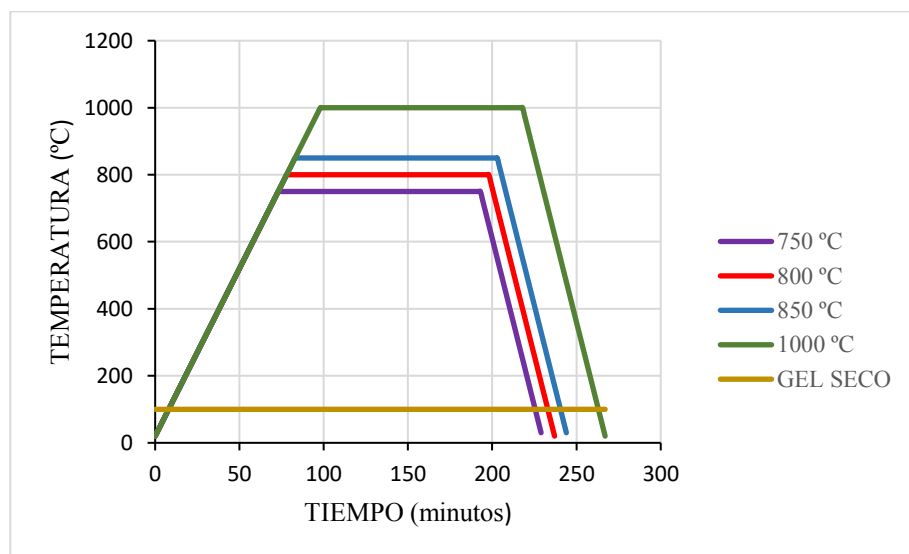


Fig. 3.15: Gráfica en la que se observan las rampas de calcinado seguidas para obtener el polvo de β -TCP, a **750 °C**, **800 °C**, **850 °C** y **1000 °C** (10 °C/min hasta alcanzar la temperatura deseada, que se mantuvo durante 120 minutos, y una rampa de enfriamiento de 20 °C/min hasta la temperatura ambiente). En el caso del **GEL SECO** corresponde al gel sometido únicamente a 100 °C en una estufa y enfriado a temperatura ambiente, sin ser sometido a tratamiento térmico en el horno.

3.1.1.2.3.1- Influencia de la temperatura de calcinación del polvo de β -TCP en la estructura y densidad real

Una vez que el material ha sido calcinado a las diferentes temperaturas, se procedió a molerlo en el molino de ágata durante 60 minutos y a tamizarlo en un tamiz con luz de 63 μm . A estos polvos se les ha realizado un análisis de difracción de rayos X, cuyos resultados se exponen en la Fig. 3.16.

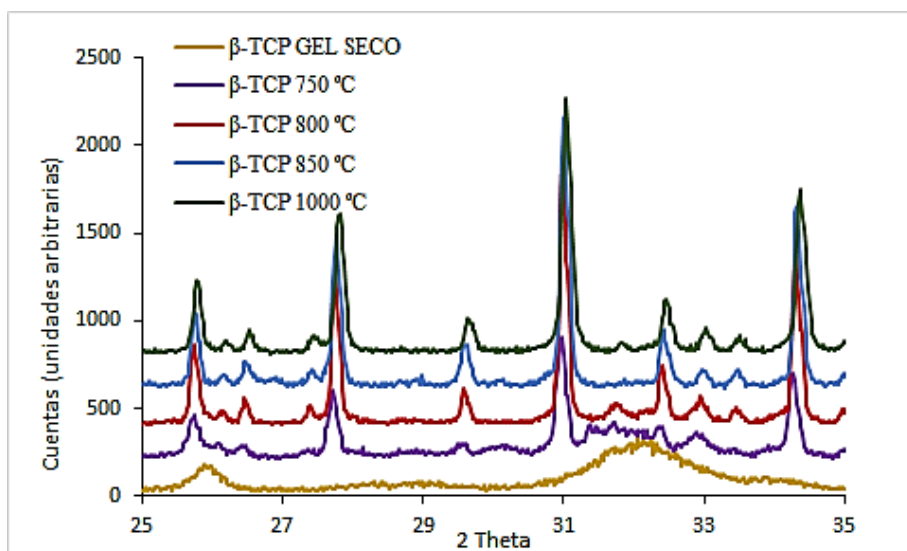


Fig. 3.16: Gráfica en la que se muestran los difractogramas obtenidos de los polvos calcinados a las temperaturas de 750 °C, 800 °C, 850 °C y 1000 °C.

En los difractogramas mostrados en la Fig. 3.16, se observa que la cristalización del material aumenta proporcionalmente a la temperatura de calcinación, hecho que se corresponde con el estrechamiento y aumento de tamaño de los picos. En el caso del GEL SECO, no hay presencia de los picos característicos de β -TCP, sino que se aprecia un espectro de picos pobremente definidos y cristalinos, siendo el pico mayor el situado a 32°, correspondiendo con fosfato cálcico amorfo (ACP), con la ficha JCPDS N° 18.0303 según las bases de datos del ICDD, en la que sus picos característicos se representan a 26.1° y entre

30 y 32°. Estos resultados coinciden con lo reportado por Franco en 2004, quién fabricó por vía húmeda como material amorfo un ACP (fosfato cálcico amorfo) a partir del cual obtuvo β -TCP (336). Sin embargo, Ghosh et Sarkar (2016), determinaron como CDHA (hidroxiapatita calcio deficiente, con la ficha JCPDS N° 09.0432 según las bases de datos del ICDD), el precursor amorfo que obtuvieron por vía húmeda en la fabricación de β -TCP. Se sabe que existe una transformación de ACP a CDHA previa a la formación de β -TCP. Dicha transformación es dependiente de factores que intervienen en la síntesis de β -TCP como son el tiempo de envejecimiento, la temperatura a la que permanece el precursor amorfo, el pH del medio (que debe ser inferior a 4.2) y la relación Ca/P (392). En el trabajo de Ghosh et Sarkar (2016), en la síntesis de β -TCP a través de la vía húmeda, mantuvieron agitando la mezcla durante 2 horas y dejaron una noche como tiempo de envejecimiento del precipitado. Este hecho pudo contribuir a la transformación de ACP a CDHA.

En la presente investigación, tras la calcinación del GEL SECO a 750 °C, no se observó presencia de CDHA, ya que se mostraron los picos característicos del β -TCP (siendo los más importantes aquellos presentes a 25.71°, 27.83°, 31.038° y 34.3°). Estos resultados concuerdan con los reportados por Descamps et al. (2013), quienes afirmaron que someter el gel seco de β -TCP a una temperatura de 750 °C produce la conversión de CDHA a cristales de β -TCP (373). Sin embargo, Ghosh et Sarkar (2016), obtuvieron β -TCP puro a temperaturas entre 700 °C y 1300 °C. A 600 °C todavía observaron la presencia de CDHA (379). Del mismo modo, Franco (2004) a partir de las investigaciones realizadas en su tesis doctoral, en las que ha realizado un estudio de DRX a muestras de β -TCP crudo, y calcinadas a 200, 400, 600, 700 y 800 °C durante 2 horas, obtuvo la transformación del precursor amorfo ACP (fosfato cálcico amorfo) a β -TCP con estructura cristalina a 700 °C.

A diferencia de lo ocurrido con el polvo de composición química hidroxiapatita, en el que su densidad real apenas sufrió oscilaciones (situándose entre 3.13 y 3.14 g/cm³), la densidad real del polvo de β -TCP varió en función de la temperatura a la que se ha sometido el

material (Tabla 3.5). Para la temperatura de sinterizado que se ha empleado en la presente investigación, que fue 1125 °C como se ha justificado, el valor de densidad real para el polvo de β -TCP se situó en 3.07 g/cm³, en concordancia con lo que refieren la mayor parte de los autores (370,373,377,378).

Tabla 3.5: Tabla en la que se muestran los resultados de la densidad real de los polvos, medida tras el tratamiento térmico a diferentes temperaturas. Se observa cómo no existen diferencias significativas entre el material calcinado a diferentes temperaturas, pero sí la hay entre el GEL SECO y los materiales calcinados. La densidad real del polvo de β -TCP disminuye a medida que aumenta la temperatura a la que es sometido.

Temperatura de calcinado (°C)	Densidad real del polvo (g/cm ³)
GEL SECO (100)	2.43
750	3.15
800	3.13
850	3.11
1000	3.10
1125	3.07

3.1.1.2.3.2- Influencia de la temperatura de calcinación en el diámetro medio y en la superficie específica del polvo de β -TCP

A los polvos obtenidos mediante la calcinación del gel seco a diferentes temperaturas, se les han realizado los análisis para determinar su tamaño medio de partícula y su superficie específica. Los resultados obtenidos con la realización de estos análisis se muestran en la Tabla 3.6 y en la Fig. 3.17.

Tabla 3.6: Resultados del diámetro medio y el área de superficie de los polvos de β -TCP en forma de gel seco, y calcinados a 750, 800, 850 y 1000 °C.

TEMPERATURA DE CALCINADO (°C)	DIÁMETRO MEDIO DE PARTÍCULA (μm)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m^2/g)
GEL SECO/CRUDO (100)	2.30	20.14
750	0.59	9.06
800	0.85	3.76
850	1.20	3.40
1000	1.45	2.25

Se ha comprobado cómo el diámetro de partícula aumenta a medida que se incrementa la temperatura de calcinación, siendo las diferencias existentes entre el GEL SECO y los polvos sometidos a una temperatura de calcinación de 750, 800, 850 y 1000 °C poco significativas. Esta tendencia está en concordancia con lo reportado por Ghosh et Sarkar (2016), aunque estos han referido una variación mayor, pasando del rango nanométrico en los polvos calcinados a 800 °C, al rango de las micras en los polvos calcinados a 1000 °C. En lo que a la morfología respecta, comprobaron que el β -TCP obtenido por vía húmeda presenta una forma poco esférica y un tamaño no uniforme (379). Del mismo modo Franco J (2004), obtuvo un aumento en el tamaño medio de partícula a medida que incrementó la temperatura de calcinación. Esta temperatura fue de 800, 900, 1000 y 1100 °C; con resultados de diámetro medio de 0.5, 1, 3 y 6 μm , y con diámetros máximos de 1, 2, 8 y 30 μm respectivamente (336). En los resultados mostrados en la Fig. 3.17, se puede observar cómo el diámetro medio de los polvos calcinados a 800 y 900 °C es similar a los resultados obtenidos por Franco en 2004 para las mismas temperaturas. En cambio, en el caso del polvo sometido a una temperatura de 1000 °C, el diámetro obtenido fue inferior, 1.45 frente a 3 μm . Chen et al. (2007), obtuvo un diámetro medio similar para el polvo de β -TCP obtenido mediante vía húmeda y calcinado a 800 °C (de 0.46 μm) (384). Descamps et al. (2013), tras moler el material de β -TCP calcinado a 1300 °C, obtuvo un polvo con

diámetro medio de 1.8 μm . Este autor indicó que un diámetro elevado en los polvos calcinados a mayor temperatura, se atribuye a que se produce una unión entre las partículas que es difícil de romper con la molienda (373,384). Esta aseveración explica el incremento del diámetro medio a medida que se somete el material a mayor temperatura.

El diámetro medio obtenido en los polvos de ambas composiciones químicas (HA y β -TCP) presentó similitudes para ambos materiales sometidos a las mismas temperaturas. A excepción de los polvos calcinados a 1000 $^{\circ}\text{C}$, en el que la HA tuvo un resultado muy superior que el β -TCP ($d_{50} = 13.25 \mu\text{m}$ para HA frente $d_{50} = 1.45 \mu\text{m}$ para β -TCP) a pesar de que su temperatura de sinterización es superior. Este resultado es atribuible a la mayor dureza de la HA, la cual dificulta la fractura de los aglomerados formados a 1000 $^{\circ}\text{C}$ para tiempos de molienda iguales que para el β -TCP sometido a la misma temperatura.

El diámetro máximo obtenido con el polvo de β -TCP fue inferior que para el material de HA en los diferentes tratamientos térmicos. Si bien para la hidroxiapatita el 90% de las partículas estaban por debajo de 20 μm , a excepción del polvo calcinado a 1000 $^{\circ}\text{C}$, que estaba por debajo de 40 μm ; en el β -TCP el diámetro máximo se encontró por debajo de 10 μm , excluyendo el polvo de 1000 $^{\circ}\text{C}$, que presentó el 90% de las partículas por debajo de 20 μm . Como se ha expuesto, los resultados del diámetro máximo para el polvo de β -TCP son superiores a los obtenidos por Franco (2004) (336). Estas diferencias, se pueden atribuir a diferencias en el tiempo de molienda. En esta ocasión no se pretendía obtener unos tamaños muy bajos de diámetro medio o de diámetro máximo, pues con pruebas realizadas empleando polvo que había sido molido previamente en molino de atricción, no se obtuvieron mejores comportamientos en la densificación del material.

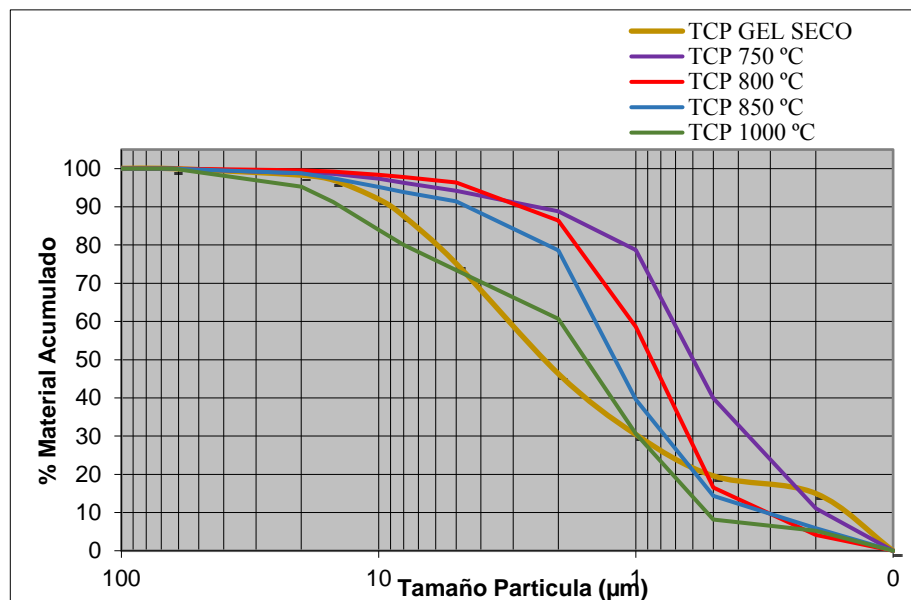


Fig. 3.17: Gráfico en el que se muestran los resultados obtenidos de diámetro medio de partícula con el sistema Sedigraph. Se puede ver como el $d_{0.9}$ es muy similar para el GEL SECO y los polvos calcinados a 750 y 800 y 850 °C, encontrándose por debajo de 10 µm. El $d_{0.9}$ del polvo calcinado a 1000°C, en cambio, está por debajo de las 20 µm. El valor de $d_{0.5}$ varía fundamentalmente para el gel seco (2.30 µm), siendo menores las diferencias entre los valores para los calcinados a 750, 800, 850 y 1000 °C entre sí (0.59 µm, 0.85 µm, 1.20 µm y 1.45 µm respectivamente).

La superficie específica, tal y como se observa en la Tabla 3.6, es muy inferior a la que presenta la hidroxiapatita para todas las temperaturas de calcinados equivalentes. Este hecho se atribuye a la diferencia en el ratio Ca/P entre ambos materiales. Descamps et al., comprobó en 2007 cómo afecta el ratio Ca/P al área de superficie de los fosfatos cálcicos, determinando que a mayor ratio Ca/P se produce un aumento de la superficie específica (377). La tendencia que sigue el área de superficie es igual a la del material HA, es decir, ésta disminuye a medida que aumenta la temperatura de calcinado. Para el GEL SECO, el valor de área de superficie es el dato más elevado (20.14 m²/g), mostrando diferencias significativas con el polvo calcinado a diferentes temperaturas. Franco (2004), en cambio, obtuvo valores de superficie específica para el ACP mucho más elevados, de entre 30 y 120 m²/g

(336). También Boilet et al. (2013) refirió valores altos de área de superficie para el GEL SECO de β -TCP, similares a los obtenidos con la hidroxiapatita en crudo fabricada en este trabajo, en torno a $60 \text{ m}^2/\text{g}$ (370). Este resultado coincide con lo reportado por Descamps et al. (2007), quién afirmó que el polvo obtenido a través de precipitación acuosa tiene una muy elevada superficie específica ($< 60 \text{ m}^2/\text{g}$) (377). Sin embargo, los resultados obtenidos para el polvo de β -TCP calcinado a 750°C son levemente superiores a los referidos por Boilet et al. (2013), $9.06 \text{ m}^2/\text{g}$ frente a $8 \text{ m}^2/\text{g}$. Los resultados con el método BET del polvo calcinado a 800 y 850°C son inferiores que los valores de superficie específica que describieron Descamps et al. (2007) para el mismo material sometido a dichas temperaturas (3.76 y $3.40 \text{ m}^2/\text{g}$, frente a 5.6 y $6.2 \text{ m}^2/\text{g}$). Sin embargo, las diferencias entre el valor de área de superficie que se ha obtenido en esta investigación y el que refiere Chen et al. (2007) para el polvo calcinado a 800°C son poco relevantes (3.76 frente a $4.72 \text{ m}^2/\text{g}$) (384). En un trabajo posterior, en 2013, Descamps et al. obtuvo valores de superficie específica para polvo de β -TCP calcinado a 1000°C de $6 \text{ m}^2/\text{g}$ previo a molienda y de $15.3 \text{ m}^2/\text{g}$ tras molerlo durante 48 horas (373). Estos valores son muy superiores a los obtenidos en el presente trabajo para la misma temperatura ($1.45 \text{ m}^2/\text{g}$ para el polvo calcinado a 1000°C). Estas diferencias mencionadas, son también atribuibles al tiempo de molienda.

3.1.1.2.3- Fabricación del granulado denso de β -TCP

Es un hecho conocido que la compactación del polvo afecta directamente a la densificación de las muestras. Factores como la presión ejercida, el tiempo durante el cual actúa y la uniformidad de la misma son determinantes. Es por ello que, en este trabajo de investigación, al igual que se ha realizado con la hidroxiapatita, se ha empleado el prensado isostático para así evitar la formación de grietas o la compactación irregular del polvo.

Por tanto, la confección de las piezas densas se ha realizado empleando 6 g de polvo calcinado a las temperaturas antes mencionadas (750, 800, 850 y 1000 °C) e introduciéndolo en un globo con ayuda de un embudo. Una vez compactado manualmente el material de forma que adquiriese forma de óvalo, se introdujo en la prensa isostática y se sometió a 3000 kg/cm². De este modo se obtuvo una pieza compacta en crudo con la morfología que se muestra en la Fig. 3.18.

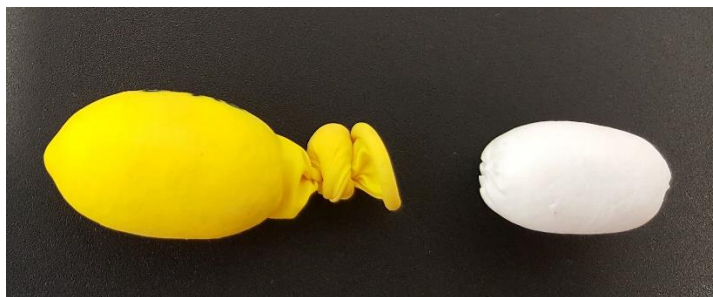


Fig. 3.18: Imagen de la pieza prensada, a la izquierda en el interior del globo y, a la derecha, tras el prensado previo a la sinterización.

En el momento en que se ha obtenido una pieza prensada, se introduce en el horno en un crisol para proceder a su sinterización. Como se ha mencionado, la temperatura que se ha empleado es de 1125 °C, con una meseta de permanencia de 3 horas, siguiendo la rampa de sinterización que se muestra en la Fig. 3.19. Como se aprecia en el difractograma representado en la Fig. 3.12, a una temperatura de 1125 °C se obtuvo β -TCP de elevada pureza, así como una densidad aparente de la pieza > 97% del valor de densidad real.

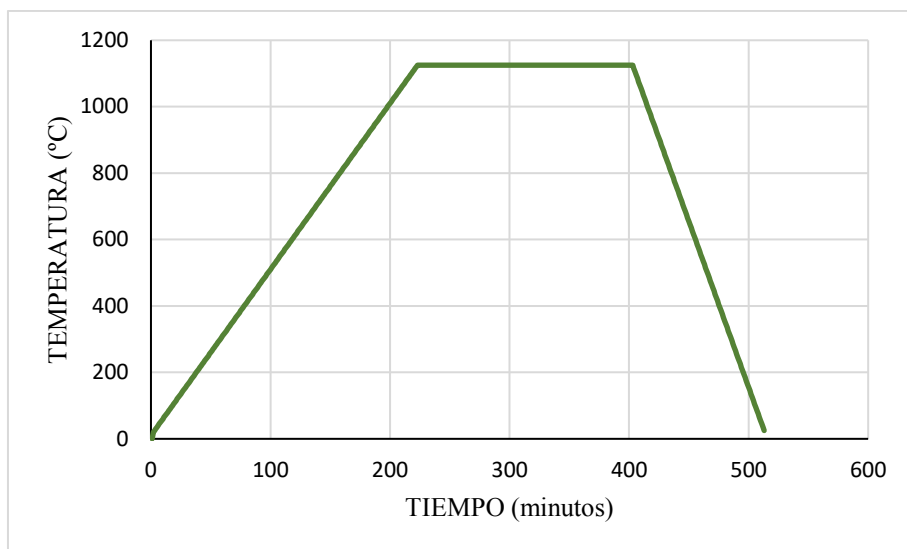


Fig. 3.19: Gráfica de la rampa de sinterización para obtener piezas densas de HA. Se ha seguido una rampa de calentamiento lenta, de 5 °C/min, de este modo se evita que se formen grietas y se favorece la densificación uniforme. Posteriormente se ha mantenido la temperatura de sinterizado a 1125 °C durante 3 horas; y finalmente, se ha seguido una rampa de enfriamiento de 10 °C/min. El ciclo de sinterización tuvo una duración total de 511 minutos.

Tras el sinterizado de las piezas confeccionadas con los diferentes polvos, se procedió a medir su densidad aparente siguiendo el método de Arquímedes y con el equipo Accupyc® de Micromeritics. Los resultados obtenidos y la comparativa de los mismos se muestra en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Tabla en la que se muestran los resultados de las densidades aparentes de las piezas prensadas isostáticamente y sinterizadas a 1125 °C. Se puede observar cómo todas las piezas presentan densidades elevadas (> 80% de la densidad real), pero son las confeccionadas con el polvo de 800 °C las que mostraron los resultados más elevados, por encima del 99% de la densidad real.

Tª DE CALCINADO DEL POVO (°C)	DENSIDAD APARENTE (g/cm ³)	PORCENTAJE DE LA DENSIDAD REAL (3.07 g/cm ³)
GEL SECO	2.74	89.25 %
750	2.96	96.41 %
800	3.04	99.02 %
850	2.94	95.77 %
1000	2.55	83.06 %

A partir de estos resultados, para obtener el granulado denso, se decidió emplear piezas densas de β -TCP obtenidas mediante el prensado isostático a 3000 kg/cm² del polvo calcinado a 800 °C, y sinterizadas a 1125 °C durante 3 horas. De este modo se trabaja con piezas que poseen un porcentaje de la densidad real muy elevado (por encima del 99%) y prácticamente igual al que se había obtenido con el material de HA; lo que hace comparable su macro y microestructura, diferenciándose únicamente en su composición química

La superficie de fractura de dichas piezas se muestra en las Fig. 3.20. De igual modo que con la HA, se obtuvieron las mayores densidades aparentes en las piezas confeccionadas a partir de los polvos obtenidos mediante calcinación a 800 °C. Este hecho se asocia como en el caso de la HA, a que el pretratamiento térmico a esta temperatura inhibe el crecimiento de grano posterior a la contracción en el sinterizado. Descamps et al. (2007) obtuvo densidades superiores al 98% de la densidad real en piezas fabricadas a partir de barbotinas con polvos precalcinaados a 850 °C, y sinterizadas a 1100 °C. Pero en esta ocasión, el autor atribuye la mejora en la densificación a la presencia de HA en la estequiometría del polvo (con valores permitidos por el

estándar ASTM F 1088-87, con cantidades inferiores al 5%). Considera que es la hidroxiapatita la que produce una inhibición en el crecimiento de grano, mejorando la sinterabilidad y obteniendo mayores densidades aparentes (377). Otros autores, no han referido la presencia de HA como un factor que contribuya a la mejora de la densificación, sino más bien todo lo contrario (360). Es sabido que la temperatura de sinterización de la HA es superior a la del β -TCP, por tanto, serían necesarias temperaturas de sinterización más elevadas para que se produjese una mejor densificación en piezas que tuviesen HA en su composición.

De igual modo que con el material de hidroxiapatita, con el β -TCP se han alcanzado densidades más elevadas con los polvos calcinados a 750, 800 y 850 °C que con el GEL SECO para la misma temperatura de sinterizado (1125 °C), sin aparición de fases secundarias como α -TCP. En cambio, para el polvo de 1000 °C, la densidad para la misma temperatura de sinterización decreció considerablemente, seguramente debido al inicio del sinterizado entre las partículas o a un comienzo del crecimiento de grano durante la pre-calcinación a dicha temperatura.

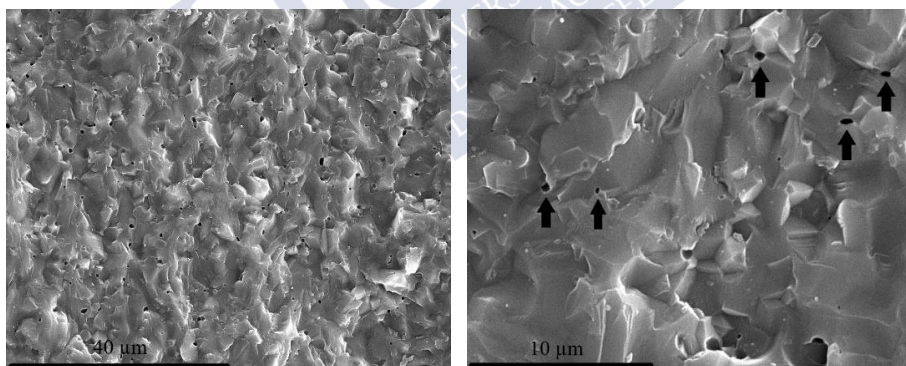


Fig. 3.20: Imágenes de dos zonas de la superficie de fractura de una pieza de β -TCP densa a diferentes aumentos. En ellas se puede observar que apenas hay presencia de porosidad, y los poros presentes son de pequeño tamaño (menores a 1 μm) y aislados (indicados con la imagen de una flecha). Al moler dichas piezas para obtener el granulado, estas romperán por las zonas con poros obteniendo así densidades muy próximas a la real en el granulado que se implantó en los conejos New Zealand.

Las imágenes presentes en el trabajo de Tampieri et al. (1997), representan piezas conformadas a partir de polvo de β -TCP prensadas isostáticamente y sometidas a una temperatura de sinterización de 1220 °C y 1260 °C durante 2 horas. Con dicho tratamiento, sus muestras presentaron densidades aparentes del 91 y 92.2% de la densidad real respectivamente. Por tanto, a pesar de haber sometido las muestras a temperaturas de sinterización mayores, la porosidad fue superior y la densidad inferior a la que se observó en las muestras obtenidas en la presente investigación (representadas en las Fig. 3.20). Además, en las muestras de Tampieri et al. (1997) hay presentes fases secundarias de α -TCP e HA, lo que contribuye al detrimento de la densificación. Por otra parte, dichas piezas están conformadas directamente con el material en crudo, es decir, sin calcinado previo, en este trabajo las densidades alcanzadas con piezas confeccionadas con el material de β -TCP en crudo tampoco alcanzaron los mejores valores de densidad aparente (89.25% de la densidad real).

Se ha comprobado que, conformando y prensando uniformemente y con la presión adecuada polvo de β -TCP calcinado a 800 °C, se pueden obtener densidades muy elevadas en las piezas fabricadas, similares a las obtenidas a través del prensado en caliente, sin necesidad de someter las muestras a altas temperaturas, evitando así la aparición de fases secundarias y obteniendo β -TCP de elevada pureza. Por otra parte, siguiendo el método del prensado isostático en frío, se evita la contaminación del material por grafito, riesgo que existe con el prensado en caliente (HIP).

Para obtener el granulado, se rompieron y molieron las piezas densas con ayuda de un mortero, desechando el material menor de 250 μ m. Para conseguir finalmente un granulado entre 250 μ m y 1 mm, con el mismo tamaño que los comerciales empleados, se introdujeron los gránulos en un molino de bolas, con bolas de alúmina, para redondear los bordes cortantes de los granos y continuar con la molienda hasta obtener el tamaño de los gránulos deseado. El tiempo total de la molienda fue de 21 horas, en intervalos de entre 2 y 5 horas, entre los que se desechó el material que se había convertido en polvo (con tamaño menor a 250 μ m), se retiró el material que oscilaba entre 250 y

710 μm , y se volvió a moler el material de tamaño superior a 710 μm . Finalmente, se obtuvo un granulado entre 250 y 1000 μm , con el 17.6% de los granos con un tamaño comprendido entre 710 y 1000 μm , y el 82.4% restante entre 250 y 710 μm (Fig. 3.21). El rendimiento de la molienda del granulado denso de β -TCP fue de un 46.26%.

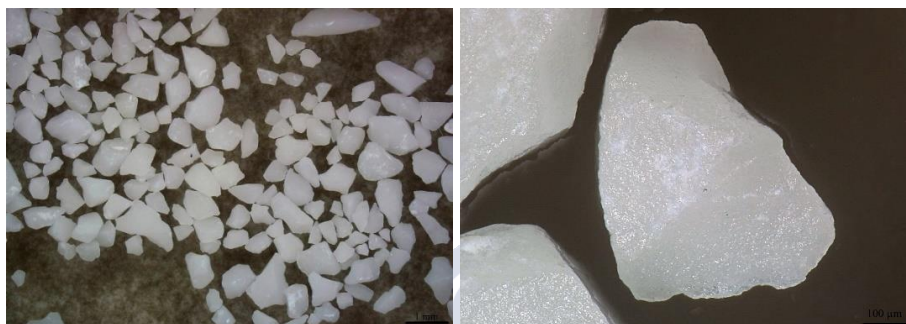


Fig. 3.21: Imágenes de microscopía óptica en las que se muestra el granulado de β -TCP fabricado en el presente trabajo de investigación. En la imagen de la izquierda, se puede observar que el tamaño del granulado se encuentra entre 250 y 1000 μm . En la imagen de la derecha se muestra la morfología de un grano en detalle.

Finalmente, se procedió a la caracterización del granulado obtenido, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.8. La pureza en la composición química del granulado de β -TCP tras el sinterizado a 1125 $^{\circ}\text{C}$ se mostró en el difractograma de la Fig. 3.12 anteriormente citado. La superficie específica se midió siguiendo el método BET, la porosidad del granulado con el sistema Accupyc de Micromeritics®, y la comprobación de las fracciones del tamaño del granulado entre 250 y 1000 μm , se detalló en el proceso de molienda de las piezas densas.

Tabla 3.8: Resultados de la caracterización del granulado de β -TCP denso.

	PUREZA (%)	TAMAÑO DE GRANULADO (mm)	POROSIDAD (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m^2/g)
GRANULADO β-TCP DENSO	≥ 99	0.25-1	0.6 ± 0.3	0.01

Para evitar la contaminación por carbono derivada de la manipulación del material, se ha calcinado el granulado a 900 °C durante 2 horas antes de proceder a su envasado. Se ha seguido una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta alcanzar los 900 °C, temperatura que se mantuvo durante 120 minutos, y una rampa de enfriamiento de 10 °C/min hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, sin manipular el material manualmente, se envasó en recipientes de plástico resistente a la radiación gamma, con una cantidad aproximada de 1 g de material en cada uno, manteniendo las proporciones mencionadas del tamaño de los granos. Finalmente, se procedió a esterilización mediante radiación gamma (Fig. 3.20). De este modo, el material estuvo preparado para ser empleado en la cirugía manteniendo las condiciones de asepsia adecuadas.



Fig. 3.20: Granulado denso de β -TCP envasado individualmente, para su empleo en una cirugía y así conservar la esterilización de los envases restantes, pudiendo ser empleados posteriormente. En los recipientes no figura el nombre de forma específica para que, tal y como se ha indicado, el operador desconozca cuál es cada uno de los materiales en el momento de su implantación, siendo esta aleatorizada.

3.1.2- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO POROSO

Tal y como se ha indicado en la introducción del presente trabajo, la mayor parte de los autores coincide en que la porosidad es una característica esencial para que un sustituto óseo induzca la formación de nuevo hueso. La microporosidad interviene en un primer estadio, para que tenga lugar la adhesión de proteínas y células que promoverán la formación ósea. La macroporosidad está relacionada con el crecimiento de hueso a través del material y la formación de nuevos vasos sanguíneos para la nutrición del mismo.

3.1.2.1- Métodos procesamiento citados en la literatura para confeccionar estructuras porosas de HA y β -TCP

Existen diferentes métodos para la formación de estructuras porosas o esponjas de biocerámicas a partir de las cuales se obtiene granulado poroso. La dificultad de lo que se ha realizado en la presente tesis doctoral radica en conseguir equiparar la micro y macroporosidad de ambos materiales, hidroxapatita (HA) y β -fosfato tricálcico (β -TCP), por su diferente comportamiento y propiedades físicas.

La gran variedad de métodos existentes permite obtener cerámicas porosas con diferentes morfologías, como estructuras tipo panal de abeja o poros interconectados de formas variadas (alargados, esféricos, etc.), incluso combinados en una misma esponja. Entre estos métodos para obtener una porosidad interconectada y de tamaño controlado destacan la técnica de espumado, la fabricación sólida de forma libre (con siglas en inglés “SFF”, solid freeform fabrication), la introducción de fases orgánicas que se calcinan posteriormente (como por ejemplo almidón), los métodos gel-casting y freeze-casting y las técnicas de replicación de esponjas, entre otras.

La calcinación de componentes orgánicos es una técnica de obtención de estructuras porosas que consiste en mezclar y prensar los

polvos cerámicos con un polímero sintético o natural de forma homogénea. Posteriormente la pieza obtenida se somete a la temperatura necesaria para su sinterización y, dado que esta temperatura es más elevada que la requerida para la pirólisis del polímero, éste se descompone dejando un cuerpo poroso. Para que la estructura no colapse durante la eliminación del componente orgánico, se incorporan aglutinantes a la mezcla. Los inconvenientes del uso de esta técnica se atribuyen a la dificultad de conseguir porosidades muy elevadas, pues se necesitaría emplear grandes cantidades del componente orgánico, lo que produciría muchos gases en la calcinación del mismo. Este hecho conllevaría a la formación de grietas en su estructura y el consecuente deterioro de sus propiedades mecánicas. Esta técnica se emplea con frecuencia para obtener biovidrios porosos (393).

La técnica anterior se puede realizar también con gránulos de almidón derivados de maíz, arroz o patata. Se realiza una suspensión que contenga los polvos cerámicos, los gránulos de almidón y agua destilada. Manteniendo la agitación de este complejo a una temperatura de 60-80 °C se forma un gel que posteriormente se calcina, eliminando de este modo el componente orgánico y dejando un esqueleto poroso compuesto por la cerámica. Es uno de los primeros métodos empleados para generar biovidrios porosos. Las desventajas del uso de esta técnica son que se obtienen piezas con baja porosidad (>40%) y que es difícil conseguir la interconexión entre los poros (197).

La técnica de espumado consiste en la incorporación de una gas externo o aire en una suspensión líquida. De este modo se obtienen poros esféricos de tamaños que oscilan entre 20 µm y 2 mm. Finalmente se calcina la estructura cerámica de modo que permanecen los espacios generados por el aire formando la porosidad deseada. La ventaja del uso de esta técnica está en que se puede someter la pieza a la temperatura de sinterización de la cerámica sin tener que pasar antes por una temperatura para el calcinado del componente orgánico, disminuyendo el riesgo de formación de grietas. Sin embargo, la dificultad de esta técnica radica en la estabilización de la espuma de aire para que no colapse y los poros puedan mantener su morfología, tamaño e

interconexiones (394). Como agentes espumantes que se puede emplear el H_2O_2 o monómeros orgánicos (sol-gel foaming, gel-cast-foaming) (395–397).

La fabricación sólida de forma libre, también denominada prototipado rápido, consiste en obtener formas porosas tridimensionales sin moldes. Son técnicas innovadoras y en auge, que permiten diseñar esponjas personalizadas según la forma y tamaño del defecto a restaurar, asistidas por ordenador (diseño CAD), a partir de imágenes diagnósticas como la tomografía axial computarizada y la resonancia magnética. Estos sistemas permiten controlar también el tamaño, la morfología y la interconexión de los poros. Otra ventaja, es la reproducibilidad de los diseños. Entre estas técnicas destacan la estereolitografía (SLA) (398), la sinterización selectiva por láser (SLS) (399) y la impresión 3-D (400). La principal desventaja de estas técnicas es su elevado coste.

Los métodos de gel-casting y freeze-casting también se han empleado para fabricar esponjas de hidroxiapatita con poros de gran tamaño y adecuadas propiedades mecánicas. En el primero, se conforma una pasta con el material en crudo, agua y una serie de aditivos (como agentes dispersantes o monómeros orgánicos) en proporciones variables según los requerimientos mecánicos de la pasta, de modo que generen un grado de cohesión tal que permita la conformación de la pieza. Se pueden emplear moldes de los cuales se extrae la pieza en crudo, o moldes que poseen la morfología deseada de la estructura en negativo y que posteriormente se calcinan. La dificultad de esta técnica está en conseguir una morfología de poros determinada e igualada. Los poros suelen ser de un tamaño mínimo de 200 μm , y la porosidad total de la pieza de entre el 26 y el 52% (401). También se han compaginado las técnicas de gel-casting y espumado, obteniendo andamios con porosidad alrededor del 90% y con poros de tamaño entre 20 μm y 1 mm, que presentan excelentes propiedades mecánicas (402).

En la presente tesis doctoral, para confeccionar estructuras porosas de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico comparables, se ha decidido emplear una variante del método comúnmente utilizado para obtener

esponjas porosas y que ha sido descrito detalladamente en la sección 2.2.2.3 (*Método de replicación de esponja*) del apartado de Material y Métodos. Se trata del “método de réplica” o también denominado el “método de replicación de esponjas” y a continuación se expone cómo se ha procedido con cada uno de los materiales estudiados.

3.1.2.2- Fabricación del granulado poroso de HA

Para realizar las esponjas porosas a partir de hidroxiapatita, se ha empleado el polvo obtenido con la síntesis explicada en el apartado 2.1.2.1 del capítulo de Material y Métodos. En esta ocasión, dicho polvo se ha calcinado a 1000 °C durante 2 horas, siguiendo una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta alcanzar 1000 °C. Se ha mantenido dicha temperatura durante 120 minutos y se ha seguido una rampa de enfriamiento de 20 °C/min hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, se molió el material en el molino de ágata durante 2 horas y se tamizó a través de un tamiz de 64 µm. Las características del polvo calcinado a 1000 °C, el cual se ha empleado para obtener el material poroso de HA, se resumen en la Tabla 3.9 que se muestra a continuación:

Tabla 3.9: Propiedades del polvo de hidroxiapatita calcinado a 1000 °C que se empleó para realizar la barbotina a partir de la cual se obtuvo el material poroso.

POLVO HA CALCINADO A 1000 °C	TAMAÑO DE PARTÍCULA (µm)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DENSIDAD (g/cm ³)
	13.25	6.35	3.13

Con este polvo que posee las características descritas, se hizo una barbotina de HA y agua, con el 70% en peso de HA y el 30% en peso de agua destilada. A esta suspensión se le añadieron dos gotas de dispersante (Reotan L), y se mezcló todo lentamente con ayuda de un agitador mecánico a baja velocidad.

Se eligió la temperatura de 1000 °C para la calcinación del polvo, debido a que las barbotinas confeccionadas con polvo de HA calcinado a temperaturas de 800 °C o inferiores, presentan una elevada viscosidad a causa del incremento de la interacción entre las partículas por su elevada área de superficie, lo que empeora el comportamiento de la barbotina (377). Por otra parte, en este trabajo, se pretendía fabricar esponjas con presencia de microporosidad; además de poseer la macroporosidad derivada de la morfología del propio material empleado como plantilla (algodón). La presencia de esta microporosidad se consiguió con la sinterización del polvo calcinado a 1000 °C (Fig. 3.23). Con el polvo obtenido de la calcinación del material a 800 °C, además de un comportamiento que dificulta la manipulación de la barbotina, la presencia de microporosidad en las piezas confeccionadas a partir de barbotinas con polvo de HA calcinado a 800 °C es escasa debido al incremento en la sinterización de las partículas de dicho polvo.

Una vez que la suspensión se ha uniformizado correctamente, se impregnó un trozo de algodón sanitario de aproximadamente 1.5 cm² en la barbotina; a continuación, se escurrieron los excesos y se ahuecaron las fibras del algodón para evitar el colapso de la estructura y, por tanto, de los poros. Este procedimiento se repitió varias veces con distintos trozos de algodón de aproximadamente el mismo tamaño. Esta secuencia de exprimido y ahuecado es de vital importancia para que el material adquiriera las propiedades mecánicas necesarias y, a su vez, también determina la porosidad de mayor diámetro. Se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente (Fig. 3.21) y se procedió, transcurrido este tiempo, a la calcinación y eliminación del componente orgánico y posterior sinterización del material cerámico hidroxiapatita. La rampa de calcinación/sinterización que se siguió para obtener las piezas de las que se obtuvo el granulado se representa en la Fig. 3.22.

Se ha decidido emplear algodón, por ser un material orgánico con una calcinación sencilla, de este modo se minimizó la formación de grietas. Además, no dejó residuos como suele ocurrir con otros materiales, por ejemplo, la esponja de mar. Por otra parte, tal y como se

puede observar en la Fig. 3.21, su estructura una vez ahuecada, recuerda al trabeculado óseo.



Fig. 3.21: Imagen de unos algodones que han sido impregnados en la barbotina y se han dejado secar a temperatura ambiente, antes de introducirlos en el horno para la calcinación del material orgánico y sinterización del material cerámico.

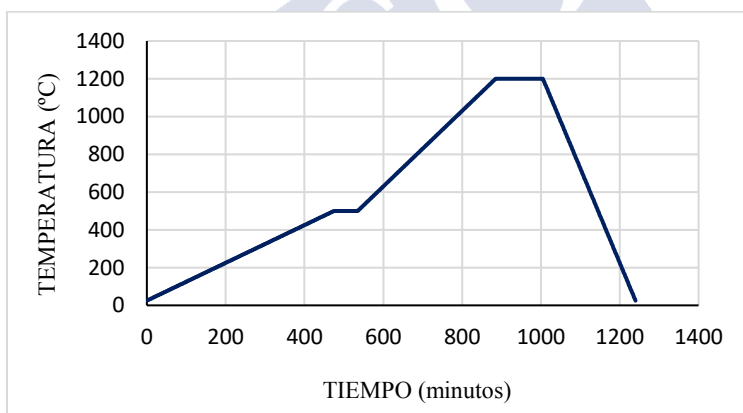


Fig. 3.22: Rampa de calcinación-sinterización que se ha seguido para eliminar la fase orgánica y sinterizar el material para obtener, de ese modo, el material poroso a partir del cual se confeccionó el granulado que fue injertado en la calota craneal de los conejos New Zealand. Como se puede observar, la rampa de calentamiento hasta eliminar el componente orgánico ha sido lenta ($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta alcanzar $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura que se ha mantenido durante 60 minutos. A continuación, se ha elevado la temperatura hasta la temperatura de sinterización de la HA ($1200\text{ }^{\circ}\text{C}$) a una velocidad de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y se ha mantenido durante 120 minutos a dicha temperatura. El enfriamiento ha sido a mayor velocidad, $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar la temperatura ambiente de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. El ciclo tuvo una duración total de 1240 minutos (casi 21 horas).

Una vez sinterizadas las réplicas en positivo de los algodones, se ha procedido a su molienda para obtener el granulado. Se ha desechado el material de tamaño inferior a $250\text{ }\mu\text{m}$ y se ha vuelto a moler el material de diámetro superior a 1 mm , para obtener finalmente un granulado de entre $250\text{ }\mu\text{m}$ y 1 mm , igual que el tamaño del granulado comercial empleado (Bio-Oss®) y que el granulado denso de la misma composición química fabricado. De igual modo que con el material denso, el granulado contiene aproximadamente un 20% de granos entre $710\text{ }\mu\text{m}$ y 1 mm y el 80% restante se sitúa entre 250 y $710\text{ }\mu\text{m}$. El rendimiento de la molienda del granulado poroso de HA se ha encontrado en torno al 55%. Este granulado obtenido se muestra en las Fig. 3.24 y 3.25. Su superficie a mayor aumento y en detalle, se muestra en la Fig. 3.23, que corresponden a fotografías de microscopía electrónica de barrido.

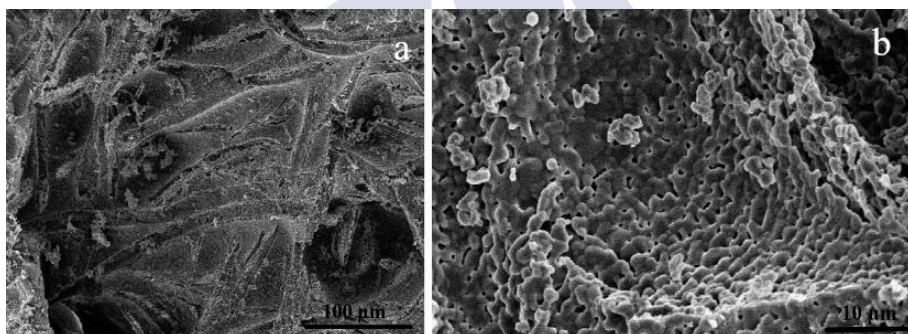


Fig. 3.23: Imágenes obtenidas en el microscopio electrónico del granulado de HA poroso confeccionado en el presente trabajo de investigación. En la imagen (a) se observan una especie de “surcos” que corresponden a las fibras de algodón que se impregnaron por la barbotina de material cerámico y han sido eliminadas durante la calcinación. También se ven los poros de mayor tamaño, que corresponden a la imitación de la estructura de los algodones. En la imagen (b) se observan los poros de menor tamaño que se han formado en la última etapa del proceso de sinterización.

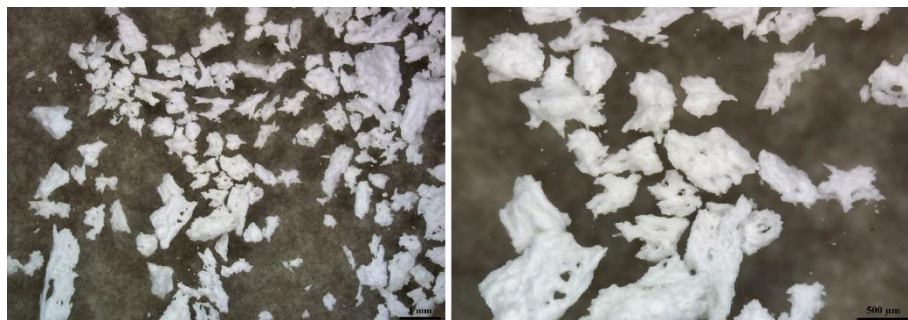


Fig. 3.24: Imágenes de microscopía óptica del granulado de hidroxiapatita poroso fabricado en la presente tesis doctoral para su implantación en conejos New Zealand. Como se observa, el tamaño de las partículas se sitúa entre 250 μm y 1 mm; del mismo modo que con el granulado denso fabricado y el poroso comercial empleado (Bio-Oss®).



Fig. 3.25: Imágenes de microscopía óptica que muestran granos de hidroxiapatita en detalle. Se aprecia la porosidad presente en los mismos, con poros de tamaño máximo de aproximadamente de 100 μm , ideales para la formación de hueso y vasos sanguíneos. También se observan irregularidades en su superficie, que incrementan su área superficial, favoreciendo la adhesión de proteínas y células sobre el material.

El granulado obtenido ha sido caracterizado del mismo como se ha procedido con los biomateriales anteriormente descritos. Tras realizar la prueba de porosimetría de Hg, se ha determinado que la porosidad presente en el material fue del 46.7%. La distribución de la misma se describe a continuación en las Fig. 3.26 y 3.27.

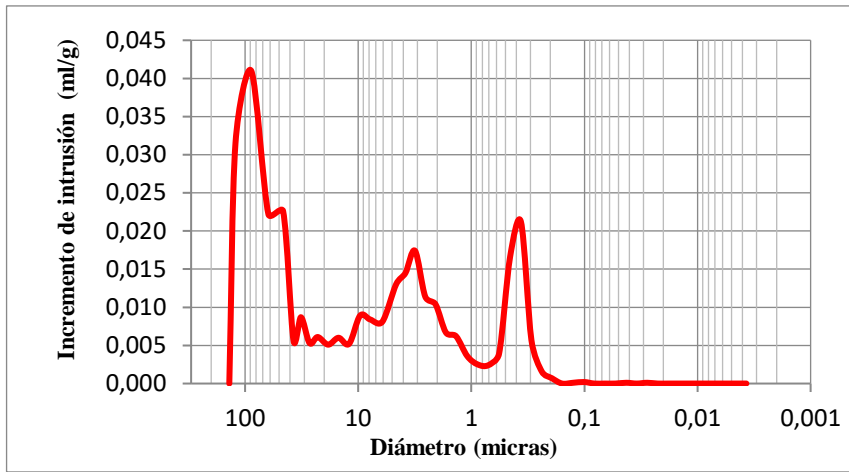


Fig. 3.26: Curva que representa la distribución de la porosidad presente en el material poroso de HA fabricado en este trabajo. Se aprecia cómo la porosidad se distribuye en tres grandes grupos. En primer lugar, están los poros de mayor tamaño dentro de esta estructura, que miden entre 15 y 40 μm ; en segundo, los poros que presentan un diámetro de entre 10 y 1 μm ; y los poros que se encuentran entre 0.5 y 0.3 μm .

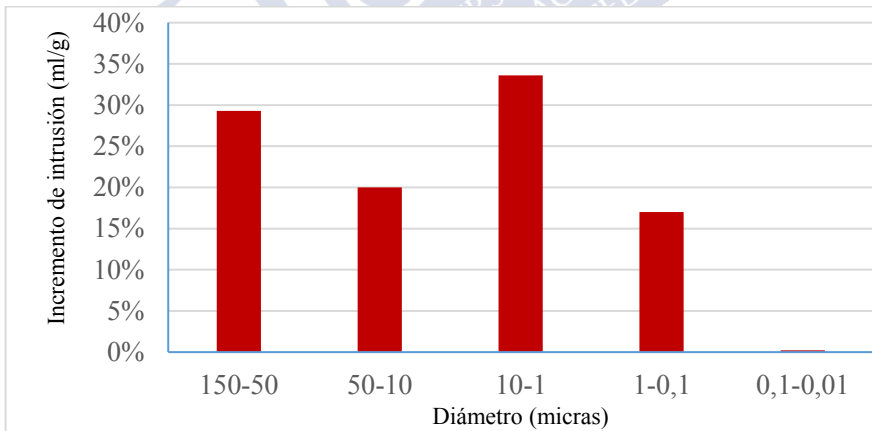


Fig. 3.27: Histograma en el que se representa la distribución de poros del granulado poroso de hidroxiapatita fabricado. Los mayores porcentajes de poros se encuentran entre 150 y 50 μm , y entre 10 y 1 μm , con porcentajes de 29.3 y 33.6% respectivamente. Entre 50 y 10 μm y entre 1 y 0.1 μm los porcentajes son del 20 y del 17%. Los poros inferiores a 0.1 μm son prácticamente inexistentes (0.2%).

Se ha evaluado su superficie específica con el método BET descrito en la sección de material y métodos, y el granulado de HA confeccionado presenta un área de superficie de $0.48 \text{ m}^2/\text{g}$. Es un resultado inferior que el obtenido para el material comercial Bio-Oss®, aloinjerto que presenta una elevada superficie específica dado que se trata de hueso bovino desproteinizado, imposible de conseguir con materiales sintéticos. Este resultado concuerda con lo reportado por Barba et al. (2017), quién indica la imposibilidad de conseguir cerámicas de fosfato cálcico sintéticas con elevada superficie específica (valor que habitualmente se encuentra entre 0.2 y $2 \text{ m}^2/\text{g}$) debido a su tratamiento térmico a elevadas temperaturas. Aun así, en su trabajo consiguió obtener piezas de HA calcio deficiente con macroporosidad cóncava y de superficie específica del orden de $38 \text{ m}^2/\text{g}$ a través de reacciones de autofraguado y sinterizado a bajas temperaturas para optimizar la osteoinducción del material de HA (327). Sin embargo, otros autores indicaron que la superficie específica de las estructuras confeccionadas con HA habitualmente se encuentra entre 20 y $90 \text{ m}^2/\text{g}$ (239,240); pero cuando presentan estas características, generalmente se trata de nanopartículas que son empleadas como transportadoras y liberadoras de fármacos.

Las características del granulado de hidroxiapatita con porosidad controlada se muestran en la Tabla 3.10 que figura a continuación:

Tabla 3.10: Resultados de la caracterización del granulado poroso de hidroxiapatita confeccionado en la presente tesis doctoral para su empleo como sustituto óseo en conejos New Zealand.

	PUREZA (%)	TAMAÑO DE GRANULADO (mm)	POROSIDAD (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m^2/g)
GRANULADO HA POROSO	≥ 99	0.25-1	46.7 ± 2.1	0.48 ± 0.02

Del mismo modo que se procedió con el material denso, para evitar la contaminación por carbono derivada de la manipulación del material, se ha calcinado el granulado a $900 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas previo a su envasado. Se ha seguido una rampa de calentamiento de $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta

alcanzar los 900 °C, los cuales se mantuvieron durante 120 minutos, y una rampa de enfriamiento de 10 °C/min hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, sin manipular el material manualmente, fue envasado en recipientes de plástico resistente a la radiación gamma, con una cantidad aproximada de 1 g de material por recipiente, manteniendo las proporciones mencionadas del tamaño de los granos. Finalmente, se procedió a su esterilización mediante radiación gamma (Fig. 3.28). Este sistema permite la utilización individual de los envases en diferentes tiempos, manteniendo las condiciones de asepsia adecuadas de los envases restantes.



Fig. 3.28: Material granulado poroso de hidroxiapatita envasado individualmente, para su empleo en una cirugía y así conservar la esterilización de los recipientes restantes, pudiendo ser empleados posteriormente. Como se puede observar, los envases presentan una morfología diferente a los de los materiales densos para evitar confusiones en su colocación. De igual modo que con el granulado denso, no figura el nombre de forma visible para que, tal y como se ha indicado, el operador desconozca cuál es cada uno de los materiales en el momento de su colocación, con el fin de que ésta sea aleatorizada.

3.1.2.3- Fabricación del granulado poroso de β -TCP

Para realizar las esponjas porosas a partir de β -TCP, se ha empleado el polvo obtenido con la síntesis detallada en la sección 2.1.2.2 de Material y Métodos. En esta ocasión, se ha calcinado el gel seco fabricado según dicho procedimiento a 1000 °C durante 2 horas, siguiendo una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta alcanzar 1000 °C, manteniendo esta temperatura durante 120 minutos y siguiendo una rampa de enfriamiento de 20 °C/min hasta enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se molió el material en el molino de ágata durante 2 horas y se tamizó a través de un tamiz de 64 μ m. Las características del polvo calcinado a 1000 °C y a partir del cual se confeccionó el material poroso de β -TCP se resumen en la Tabla 3.11 que se muestra a continuación:

Tabla 3.11: Propiedades del polvo de beta-fosfato tricálcico calcinado a 1000 °C que se empleó para realizar la barbotina a partir de la cual se obtuvo el material poroso.

POLVO β -TCP CALCINADO A 1000 °C	TAMAÑO DE PARTÍCULA (μ m)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DENSIDAD (g/cm ³)
	1.45	2.25	3.10

Con este polvo descrito, se confeccionó una barbotina de β -TCP y agua, con el 70% en peso de β -TCP y el 30% en peso de agua destilada, del mismo modo que se realizó con la HA. A esta suspensión se le añadieron dos gotas de dispersante (Reotan L), y se mezcló todo lentamente con ayuda de un agitador mecánico a baja velocidad. Se eligió la temperatura de calcinación del polvo de 1000 °C, debido a que las barbotinas confeccionadas con polvo de β -TCP calcinado a temperaturas de 800 °C o inferiores, presentan una elevada viscosidad y empeoramiento del comportamiento de la barbotina; tal y como sucedía con las barbotinas realizadas con HA, a causa del incremento de la interacción entre las partículas a pesar de no alcanzar superficies específicas tan elevadas como con la HA (377). Por otra parte, un objetivo de este trabajo fue el conseguir esponjas cuya microporosidad tuviese un tamaño tal que permitiese su colonización por proteínas y

células que intervienen en los primeros estadios de la formación de hueso; además de poseer la macroporosidad derivada de la morfología del propio material empleado como plantilla (algodón), que toma partido en la angiogénesis y nutrición del nuevo hueso. Esta microporosidad se consiguió gracias al crecimiento de grano que se produce en las piezas conformadas con el polvo calcinado a 1000 °C previo conformación y sinterización, que deja poros de pequeño tamaño (en torno a 1 μm) entre dichos granos (Fig. 3.31). En cambio, tal y como se ha explicado en el apartado 1.2. de este capítulo, con el polvo calcinado a 800 °C se obtienen poros escasos en tamaño y número, debido al incremento en la sinterización de las partículas en el polvo calcinado a 800 °C, de igual modo que sucede con la hidroxiapatita.

Una vez que la suspensión se ha uniformizado correctamente, se impregnó un trozo de algodón sanitario de aproximadamente 1.5 cm² en la barbotina, a continuación, se escurrieron los excesos y se ahuecaron las fibras del algodón para evitar el colapso de la estructura y, por tanto, de los poros. Este procedimiento se repitió varias veces con distintos trozos de algodón de aproximadamente el mismo tamaño. Esta secuencia de exprimido y ahuecado es de vital importancia para que el material adquiriera las propiedades mecánicas necesarias y, a su vez, también determina la macroporosidad. Derivado del hecho de que las propiedades mecánicas del β -TCP son inferiores a las de la HA, fue el β -TCP el material que marcó el límite de porosidad alcanzable con esta técnica. Pues si se escurrían o ahuecaban demasiado las esponjas confeccionadas con este material, estas apenas resistían el sinterizado perdiendo su integridad. Por tanto, hubo que disminuir la porosidad de la HA para equipararla al límite de porcentaje de macroporos que se conseguía con el β -TCP, con el fin de que el andamio poroso obtenido presentase la suficiente resistencia mecánica.

Una vez impregnados los algodones, se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente (Fig. 3.29) y se procedió, transcurrido este tiempo, a la calcinación y eliminación del componente orgánico y posterior sinterización del material cerámico β -TCP a su temperatura

(1125 °C). La rampa de calcinación/sinterización que se siguió se representa en la Fig. 3.30.



Fig. 3.29: Imagen de algodones que han sido impregnados en la barbotina y se han dejado secar a temperatura ambiente, antes de introducirlos en el horno para la calcinación del material orgánico y sinterización del material cerámico.

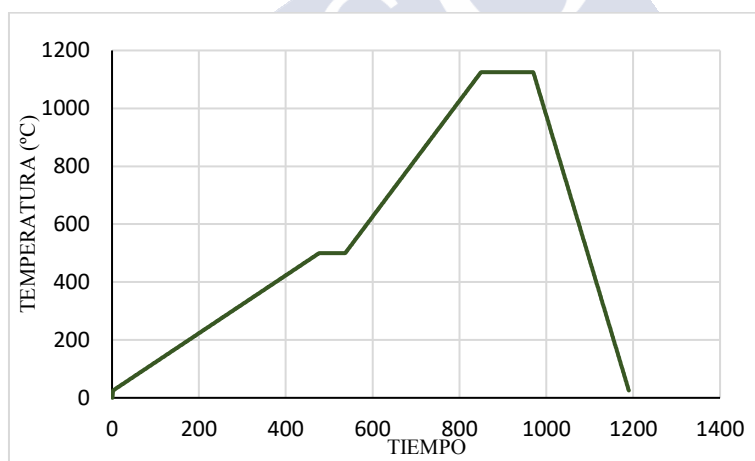


Fig. 3.30: Rampa de calcinación-sinterización que se ha seguido para eliminar la fase orgánica y sinterizar el material cerámico β -TCP. Como se puede observar, la rampa de calentamiento hasta eliminar el componente orgánico ha sido lenta (1 °C/min) hasta alcanzar 500 °C, para evitar la formación de grietas y la fractura de la estructura cerámica. Esta temperatura de 500 °C se ha mantenido durante 60 minutos. A continuación, se ha elevado hasta la temperatura de sinterización del β -TCP (1125 °C) a una velocidad de 2°C/min, y se ha mantenido durante 120 minutos. El enfriamiento ha sido a mayor velocidad, 5°C/min hasta alcanzar la temperatura ambiente de 25 °C. El ciclo tuvo una duración total de 1187.5 minutos (casi 20 horas).

Una vez sinterizadas las réplicas en positivo de los algodones, del mismo modo que se ha procedido con la HA, se ha molido el material de β -TCP para obtener el granulado. Se ha desechado el material de tamaño menor a $250\ \mu\text{m}$ y se ha vuelto a moler el material de tamaño superior a $1\ \text{mm}$, obteniendo un granulado de entre $250\ \mu\text{m}$ y $1\ \text{mm}$, del mismo tamaño que los granulados del biomaterial comercial (KeraOs®) y el granulado de β -TCP denso fabricado. De igual modo que con el material denso, el granulado poroso poseyó aproximadamente un 20% de granos entre $710\ \mu\text{m}$ y $1\ \text{mm}$, y el 80% restante se situó entre 250 y $710\ \mu\text{m}$. El rendimiento de la molienda del granulado poroso de β -TCP ha sido inferior al que presentó el material de HA, de aproximadamente del 37%. Este resultado se atribuye al hecho de que la resistencia a la compresión es inferior en el β -TCP que en la HA. Por otra parte, como ya se ha mencionado, fue el material de β -TCP el que delimitó el volumen de poros que podía contener el material poroso sin perder sus propiedades mecánicas y su integridad. A partir de los valores obtenidos por el mismo, se intentó equiparar la porosidad de la HA en el proceso de escurrido y ahuecado de los algodones.

El granulado con porosidad controlada confeccionado con polvo de β -TCP y su superficie se muestran en las Fig. 3.31, Fig. 3.32 y Fig. 3.33.



Fig. 3.31: Imágenes tomadas con microscopio óptico de los granos de β -TCP en detalle. Se aprecia la porosidad presente en los mismos, con poros alargados de aproximadamente de $100\ \mu\text{m}$, ideales para la formación de hueso y vasos sanguíneos. También se observan irregularidades en su superficie, que incrementan su área de superficie, favoreciendo la adhesión de proteínas y células.

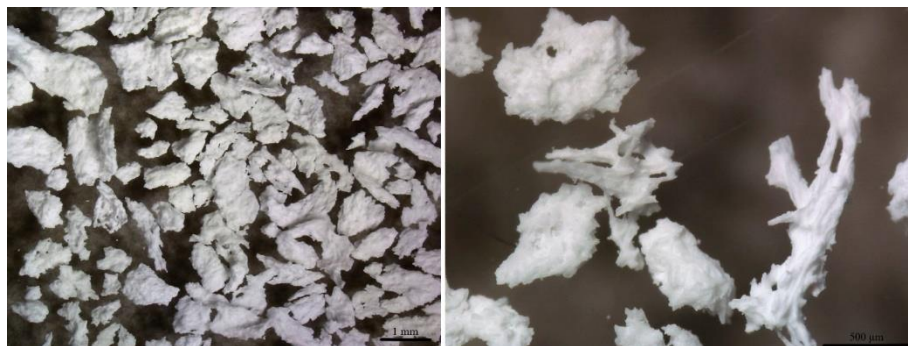


Fig. 3.32: Imágenes de microscopía óptica en las que se muestra el granulado de beta-fosfato tricálcico poroso fabricado en la presente tesis doctoral para su implantación en conejos New Zealand. Como se observa, el tamaño de las partículas se sitúa entre 250 μm y 1 mm; del mismo modo que con el granulado denso fabricado y el poroso comercial empleado (KeraOs®).

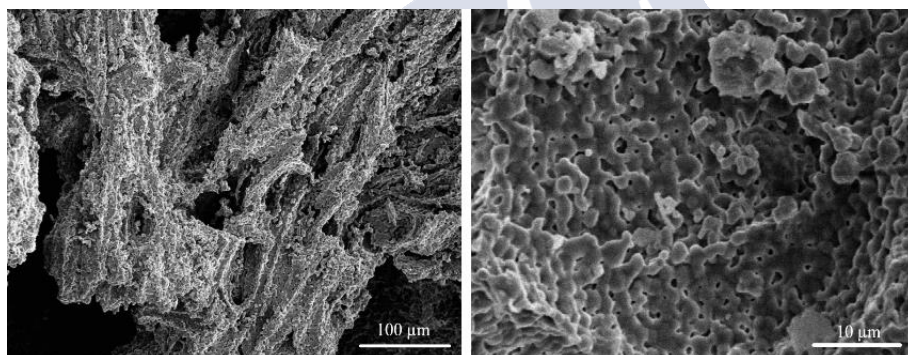


Fig. 3.33: Imágenes de microscopía electrónica de la superficie del granulado de β -TCP poroso confeccionado en el presente trabajo de investigación. En la imagen de la izquierda se observan los “surcos” correspondientes a las fibras de algodón que se impregnaron por la barbotina de material cerámico y han sido eliminadas durante la calcinación. También se ven los poros de mayor tamaño, que corresponden a la imitación de la estructura de los algodones. En la imagen de la derecha se observan los microporos que se han formado en la última etapa del proceso de sinterización.

El granulado obtenido ha sido caracterizado del mismo modo que el material comercial y el material denso que se han descrito con anterioridad. Tras realizar la porosimetría de Hg, se ha determinado que la porosidad total presente en el granulado de β -TCP fue del 45.9%,

muy similar a la del granulado de HA. La distribución de la misma se describe a continuación en la Fig. 3.33 y en la Fig. 3.34.

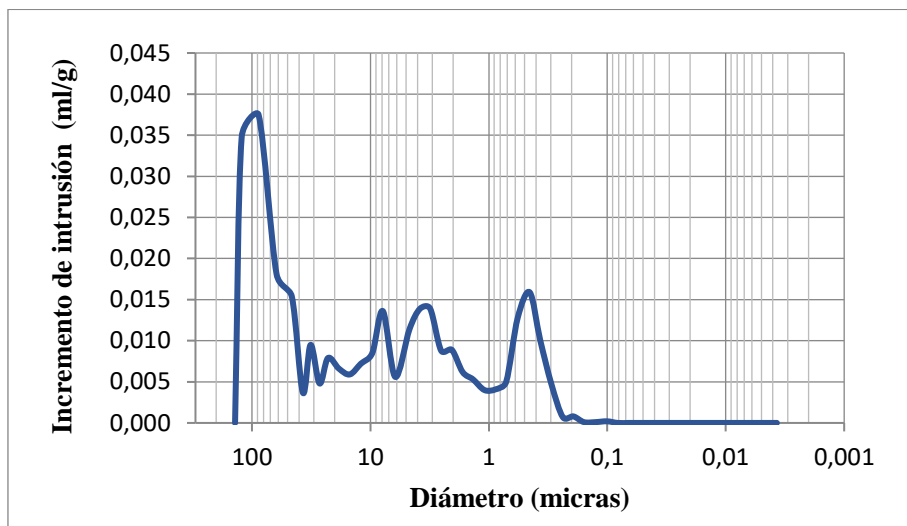


Fig. 3.33: Curva de distribución del volumen poroso del granulado de β -TCP fabricado con porosidad controlada. De igual modo que ocurría con el granulado de hidroxiapatita, los poros se distribuyen en tres grupos. Se observa una primera curva que representa aquellos poros que tienen un diámetro comprendido entre 150 y 40 μm ; una segunda que se corresponde con los que se encuentran en el rango entre 10 y 2 μm ; y por último, una tercera curva que indica los poros de menor tamaño, situados entre 0.2 y 0.5 μm .

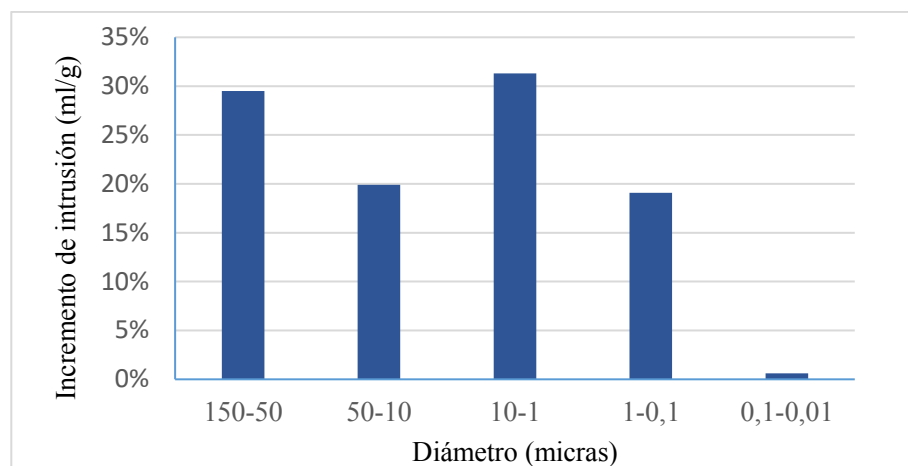


Fig. 3.34: Histograma en el que se representa la distribución de poros del granulado poroso de β -TCP fabricado en el presente trabajo. Como se puede observar, la distribución de los poros es prácticamente igual que la que presentó el granulado de HA. Hay una presencia mayor de poros que miden entre 150 y 50 μm , y entre 10 y 1 μm , con porcentajes de 29.5 y 31.3% respectivamente. Los poros situados entre 50 y 10 μm y entre 1 y 0.1 μm se presentan en porcentajes del 19.9 y 19.1%. Los poros inferiores a 0.1 μm son prácticamente inexistentes, pues representando el 0.6% del total de poros.

El valor del área de superficie del granulado de β -TCP obtenido mediante el método BET descrito fue de $0.40 \text{ m}^2/\text{g}$. Éste es un resultado ligeramente superior al obtenido para el material comercial KeraOs®, el cual fue de $0.28 \text{ m}^2/\text{g}$. Esta diferencia, a pesar de no ser muy significativa, se puede atribuir al hecho de que la porosidad en el material confeccionado en este trabajo fue superior a la que presentó el material comercial (45.9% frente a 21.2%). La superficie específica alcanzada con el β -TCP en trabajos previos es inferior a la lograda con el material de hidroxapatita, con valores en torno al $2.5 \text{ m}^2/\text{g}$ (279); de todos modos, tal y como se ha mostrado en los resultados de este trabajo, dicho valor es superior a los que presentaron los granulados de β -TCP empleados en la presente investigación, tanto el granulado comercial (KeraOs®) como los granulados de β -TCP sintetizados en el presente trabajo (denso y poroso).

Por último, las características del granulado de β -fosfato tricálcico con porosidad controlada fabricado en la presente tesis doctoral, se muestran en la Tabla 3.11 que figura a continuación.

Tabla 3.11: Resultados de la caracterización del granulado poroso de hidroxiapatita confeccionado en la presente tesis doctoral para su empleo como sustituto óseo en conejos New Zealand.

	PUREZA (%)	TAMAÑO DE GRANULADO (mm)	POROSIDAD (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)
GRANULADO β-TCP POROSO	≥ 99	0.25-1	45.9 ± 1.8	0.40 ± 0.01

Del mismo modo que se procedió con el material denso, para evitar la contaminación por carbono derivada de la manipulación del material para su fabricación, se ha calcinado el granulado a 900 °C durante 2 horas antes de proceder a su envasado. Se ha seguido una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 900 °C, la cual se mantuvo durante 120 minutos, y una rampa de enfriamiento de 10 °C/min hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, sin manipular el material manualmente, éste fue envasado en recipientes de plástico resistente a la radiación gamma, con una cantidad aproximada de 1 g de material por recipiente, manteniendo las proporciones mencionadas del tamaño de los granos. Finalmente, se procedió a esterilización mediante radiación gamma (Fig. 3.35). De este modo, el material quedó preparado para ser empleado en la cirugía manteniendo las condiciones de asepsia adecuadas.



Fig. 3.35: Material granulado poroso de β -TCP envasado individualmente, para su empleo en una cirugía y así conservar la esterilización de los recipientes restantes, pudiendo ser empleados posteriormente. Como se puede observar, los envases presentan una morfología diferente a los de los materiales densos para evitar confusiones en su colocación. De igual modo que con el granulado denso, no figura el nombre de forma explícita para que, tal y como se ha indicado, el operador desconozca cuál es cada uno de los materiales en el momento de su colocación en los defectos de manera que su colocación en los defectos sea aleatorizada.

3.2- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS RADIOLÓGICO E HISTOLÓGICO

Transcurridas 16 semanas desde la implantación de los biomateriales, se procedió a su análisis histológico cualitativo e histomorfométrico. En ningún caso se han apreciado complicaciones postoperatorias como reacciones de rechazo a los materiales empleados, o presencia de signos de infección. Tras la administración de la medicación postoperatoria mencionada en el apartado 2.2.3.2 del capítulo de Material y Métodos, correspondiente al protocolo quirúrgico seguido con los animales y, hasta alcanzar la semana decimosexta, no se registraron complicaciones ni fue necesario el empleo de medicación adicional en ninguno de los animales.

3.2.1- HALLAZGOS RADIOLÓGICOS

Antes de proceder a la toma de las muestras, se han realizado radiografías con placas oclusales para verificar las zonas en las que se han realizado los defectos óseos y se han empelado los sustitutos óseos confeccionados en el presente trabajo. En estas imágenes radiográficas (Fig. 3.36 y Fig. 3.37), se observaron los 4 defectos circulares realizados en cada una de las calotas craneales con diferente radiopacidad y radiolucidez, en función del biomaterial injertado. Este método diagnóstico carece de capacidad para determinar si ha existido o no formación de hueso y la cantidad o calidad del mismo; pues además de la ubicación de los implantes, la información restante que aporta sobre la formación de hueso nuevo y la reabsorción de los materiales es orientativa. Con el empleo de rayos X, solamente se aprecian imágenes con diversas tonalidades de grises. Estas tonalidades representan diferentes densidades en las estructuras. A mayor densidad del material, más clara se observa la imagen; es decir, más radiopaca o con mayor radioopacidad. Este fenómeno tiene lugar en las zonas de hueso denso o de colocación de los biomateriales. Por otra parte, los materiales o estructuras de baja densidad, como aire, agua o grasa, se observan oscuros en la imagen, dicho de otro modo, con mayor radiolucidez o radiolúcidas.

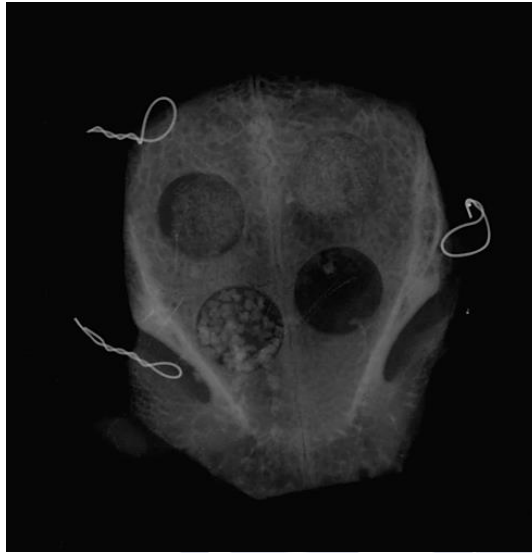


Fig. 3.36: Imagen en la que se observan los 4 defectos óseos con diferentes intensidades. De izquierda a derecha y de arriba abajo: En la primera cavidad se observan perfectamente definidos los márgenes del defecto, con una ligera radiopacidad interna que corresponde con el material de injerto empleado. En el defecto situado a su derecha, se observa cómo los márgenes del mismo están más difuminados, lo que puede insinuar que se ha producido hueso nuevo que regeneró el defecto. En la cavidad situada abajo y a la izquierda, además de los márgenes del defecto, se pueden visualizar gránulos de material. En esta ocasión, parece que no hay presencia de hueso uniéndolos las partículas de material, y que las mismas apenas han sufrido su disgregación. En el último defecto, situado abajo a la derecha, se aprecia perfectamente una cavidad con ausencia de material y hueso, descripción que corresponde con la zona empleada como CONTROL.



Fig. 3.37: Radiografía de una calota craneal en la que se han realizado diferentes defectos. En esta ocasión, se puede observar que hay ausencia del agujero empleado como CONTROL; pues se observan que los defectos están rellenos con hueso, biomaterial, o una combinación de ambos; mostrando diferentes radiopacidades.

3.2.2- HALLAZGOS HISTOLÓGICOS CUALITATIVOS

3.2.2.1- Control

En los defectos en los que no se ha introducido ningún material, cómo se ha producido la formación de hueso se muestra en la Fig. 3.38. En este conjunto de imágenes se observa cómo el hueso nuevo se ha formado con morfología de cordones óseos que comienzan en los extremos del defecto, uniéndose hacia el centro del mismo. En todas se aprecia cómo el cierre del defecto todavía es incompleto. La médula ósea es madura en los extremos de los muñones en formación. En la zona intermedia, en cambio, se presenta estroma mesenquimal entre las trabéculas óseas neoformadas. En la zona exocraneal, debajo de la membrana, hay tejido fibroso muy denso; en la zona endocraneal, el periostio se muestra bien diferenciado encima de la meninge.

El cierre se ha producido en primer lugar en la zona exocraneal, en contacto con la membrana. Este hecho se fundamenta en la capacidad osteogénica de la membrana, que además de producir la separación del defecto en dos compartimentos, permite la vascularización a través de su estructura porosa, aportando nuevas células mesenquimales con capacidad de diferenciarse en osteoblastos. Transcurridas 16 semanas ya no hay presencia de la membrana, pues su degradación suele ser completa a las 12 semanas, permaneciendo tejido conectivo en su lugar. La capacidades osteogénica y osteoinductora de la membrana que se han observado en este trabajo, ya habían sido reportadas por diferentes autores con anterioridad (403,404).

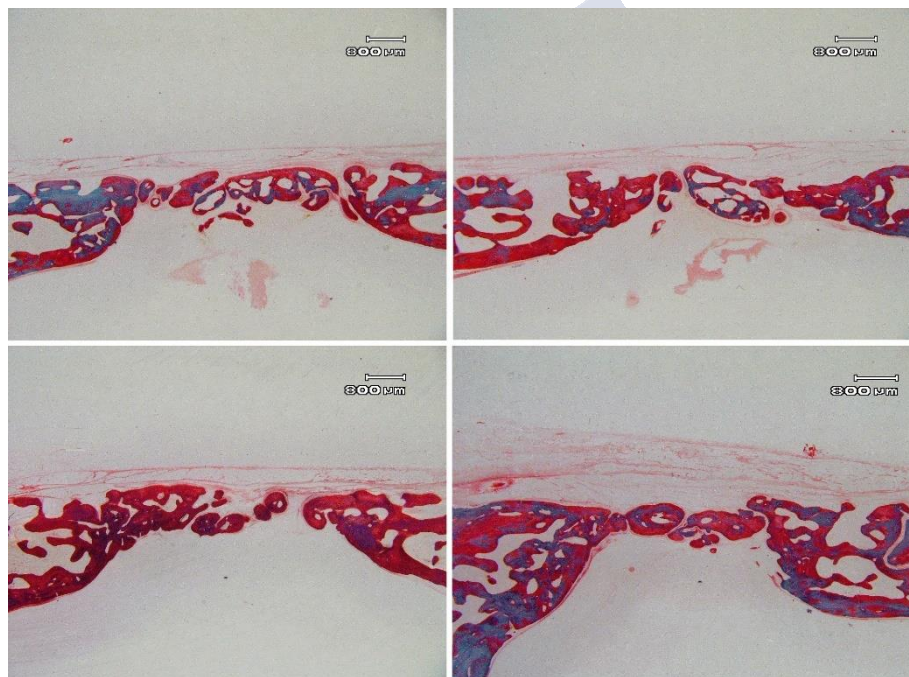


Fig. 3.38: Imágenes de las láminas delgadas obtenidas a partir de diferentes defectos a los que no se les ha introducido biomaterial de injerto óseo tras el transcurso de 16 semanas. Tal y como se ha indicado, se observa que la formación de hueso parte desde los extremos del defecto para unirse en el centro del mismo, dónde todavía es hueso inmaduro y no ha logrado producir el cierre completo de la cavidad. Hay mayor cantidad de hueso hacia la zona exocraneal que hacia la zona endocraneal.

3.2.2.2- Biomateriales comerciales

3.2.2.2.1- Bio-Oss®

Los defectos en los que se implantó Bio-Oss® como material de regeneración ósea, muestran un cierre completo en la zona exocraneal a raíz de la formación de hueso trabecular, transcurridas 16 semanas desde la cirugía. Este hueso presenta médula ósea madura, con células hematopoyéticas y adipocitos, y estructura de hueso laminar. En la zona intracraneal, en cambio, no se observa la formación completa del puente óseo, sino que en su lugar hay muñones de crecimiento aislados formados por hueso inmaduro o plexiforme alrededor de las partículas, junto con la presencia de estroma mesenquimatoso. El hueso crece en la superficie del material y une las partículas formando una especie de entramado. A partir de estos hallazgos, se puede afirmar que existe una osteoaposición directa del hueso sobre el material. Se aprecia perfectamente la capacidad osteoconductiva que presenta este material, las partículas de Bio-Oss® actúan como un andamio orientando el crecimiento de los vasos sanguíneos y del sistema de Havers tridimensionalmente. El periostio, sin embargo, cubre tanto el hueso presente en la zona exocraneal como endocraneal. La membrana fue completamente reemplazada por una capa fibrosa densa que reconstruyó la galea aponeurótica en su totalidad (Fig. 3.39 y Fig. 3.40).

El material ha sufrido una leve degradación, distinguiéndose todavía las partículas de este. Muchos autores han catalogado el Bio-Oss® como un material casi bioinerte debido a su lenta reabsorción en el cuerpo humano, permaneciendo en el mismo incluso transcurridos 10 años desde la intervención (188,189). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que su capacidad más destacable es la osteoconducción.

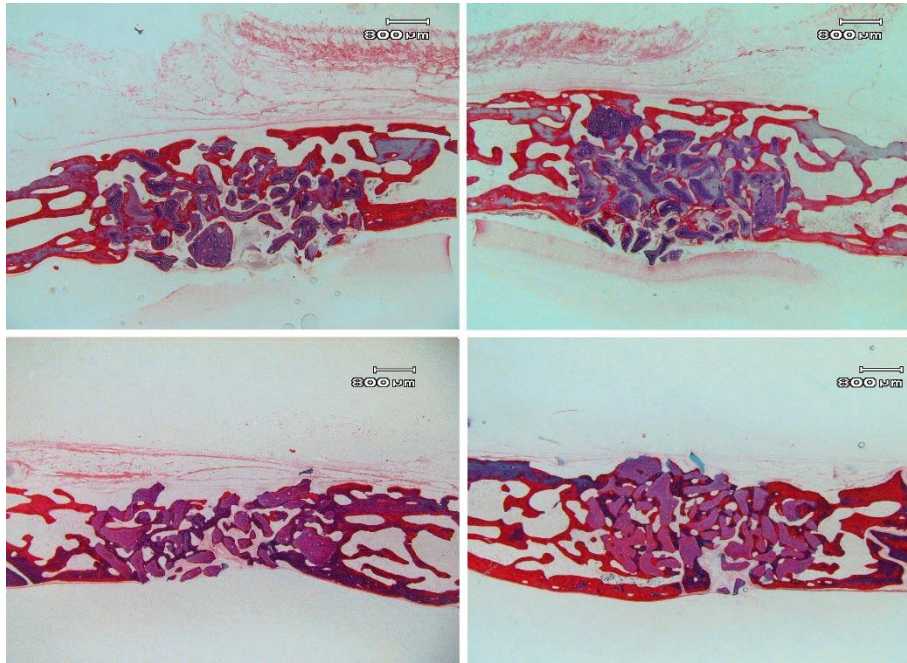


Fig. 3.39: Imágenes de láminas delgadas de los defectos que han sido regenerados con biomaterial Bio-Oss® 16 semanas después de su implantación. Se observa cómo las partículas actúan de andamio para el hueso nuevo, lo que demuestra su bioactividad. Por otra parte, las partículas de material se distinguen perfectamente y su presencia es notable porque apenas han sufrido degradación. Este hecho coincide con lo referido en la literatura, con respecto a que la hidroxiapatita, componente principal de Bio-Oss®, pues se trata de un material que presenta una tasa de reabsorción muy baja o, dicho de otro modo, una bioestabilidad muy acusada.

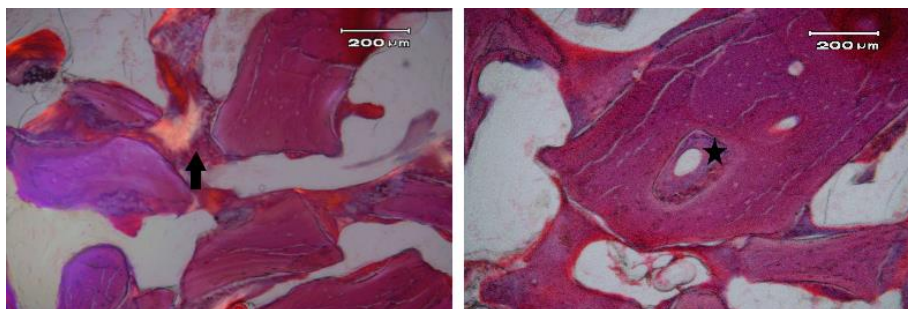


Fig. 3.40: Imágenes que muestran el crecimiento de hueso alrededor de las partículas de Bio-Oss® transcurridas 16 semanas desde su implantación. Se aprecia una estrecha unión del hueso nuevo alrededor de las partículas de material, íntimamente en contacto con las mismas, sin interposición de tejido fibroso. En la imagen de la izquierda, gracias a la luz polarizada, se distingue el hueso nuevo trabecular que se forma alrededor de las partículas remanentes (imagen de flecha), con una estructura poco organizada y fibras no paralelas. En la imagen de la derecha, se observa cómo crece hueso con configuración Haversiana en el interior de las estructuras vasculares de Bio-Oss® (indicado con la imagen de una estrella).

3.2.2.2.2- KeraOs®

Con el empleo del sustituto óseo KeraOs® en los defectos óseos de 7 mm confeccionados en la calota craneal de conejos New Zealand, se han estudiado las láminas delgadas confeccionadas a partir de las muestras tomadas de dichos defectos transcurridas 16 semanas (Fig. 3.41 y Fig. 3.42). En ellas se aprecia cómo el cierre del defecto ha comenzado en la zona endocraneal, y el hueso que se encuentra en dicha zona ha comenzado a sufrir un proceso de remodelación. Este hecho es contrario a lo observado en las muestras de Bio-Oss®, en las que el cierre se produjo en primer lugar en la zona exocraneal. El hueso presente en la zona central no es maduro en su totalidad, tal y como es el que se aprecia hacia los extremos del defecto, donde hay presencia de hueso laminar, con una médula ósea madura que contiene tejido adiposo (Fig. 3.42). En el centro de la cavidad, el hueso nuevo rodea las partículas de material y ha comenzado a establecer zonas de unión entre sí. Zerbo et al. (2006) observaron alrededor de las partículas de β -TCP

tejido conectivo blando transcurridos 6 meses desde la implantación del material (269). En la presente investigación, el tejido conectivo se encuentra entre los centros de osificación compuestos por partículas de material y hueso que hay en el centro del defecto. En algunos casos, ha desaparecido tras la formación de puentes óseos entre las distintas partículas. No se observa, en cambio, interposición de tejido blando entre el material y el hueso, habiendo una aposición directa del tejido óseo sobre las partículas de material.

La membrana fue sustituida por tejido conectivo laxo fundamentalmente (no se observa la forma de paquetes típica de los haces de colágeno). Debajo de lo que fue la membrana, hay periostio desarrollado; y encima de ella, se observa una cápsula de tejido fibroso denso. Ambos estratos de la membrana (capa interna y externa) se han convertido en estratos fibrosos, y entre ambos hay tejido adiposo que contiene células linfocitarias, macrófagos, osteoclastos... En la zona endocraneal, también se observa periostio desarrollado sobre la meninge.

La reabsorción observada en el material KeraOs® fue mayor que la sufrida por el material Bio-Oss®. Su marcada disolución se ve provocada por la concentración Ca/P que presenta. De todos modos, se observa todavía la presencia de gránulos de KeraOs® ya que, según los distintos estudios, su completa disolución no se produce hasta transcurridos 6-12 meses, en función de diversos factores como la porosidad del material, la cantidad de material implantado en el defecto, etc. (242,268).

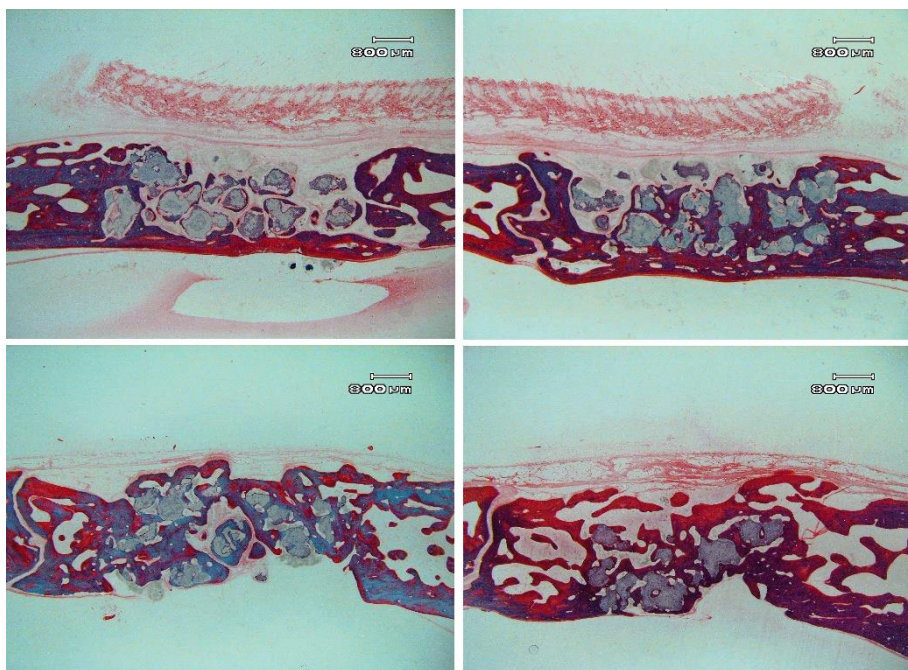


Fig. 3.41: Imágenes de láminas delgadas de los defectos que han sido rellenos con biomaterial KeraOs® 16 semanas después de su implantación. Se observa cómo las trabéculas plexiformes de hueso neoformado que se desarrollaron rodeando las partículas de material remanente disueltas, se han unido entre sí formando “puentes” de hueso, demostrando la capacidad osteoconductiva del material. La médula ósea entre las distintas partículas de material no es madura en algunas zonas, sino que está formada por estroma mesenquimal. En cambio, existen partes en las que sí lo es; observándose en ella adipocitos, células del sistema retículo endotelial y células gigantes de cuerpo extraño.

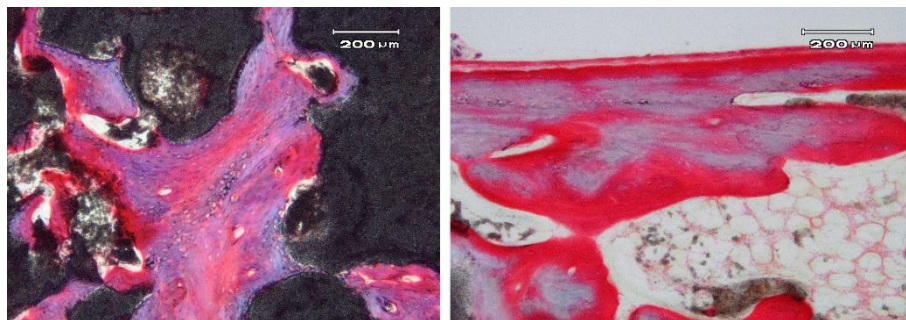


Fig. 3.42: Imágenes obtenidas con microscopio estereoscópico. En la imagen de la izquierda se observa cómo el hueso se ha formado directamente aposicionado sobre las partículas de material, sin interposición de tejido blando. Este hueso neoformado que rodea las partículas, las ha unido entre sí. En la imagen de la derecha se observa cómo parte del material ha pasado a tejido blando (tejido adiposo), hecho originado por la gran disgregación de material debido a su bioactividad.

3.2.2.3- Biomateriales densos

3.2.2.3.1- Granulado denso de HA

Se ha procedido a la evaluación histológica de las láminas delgadas realizadas a partir de las muestras tomadas de los defectos que han sido rellenados con granulado de hidroxiapatita totalmente denso confeccionado en el desarrollo de esta tesis.

En ningún caso se ha determinado la presencia de reacciones inflamatorias, fibrosis o encapsulación de las partículas del material. El hueso nuevo se ha depositado directamente sobre el material, sin interposición de tejido fibroso, lo que se corresponde con el fenómeno anteriormente descrito en la introducción de osteoaposición (Fig. 3.43).



Fig. 3.43: Lámina delgada de un corte horizontal que corresponde a un defecto regenerado con granulado denso de hidroxiapatita. Se observa cómo la mayor parte de hueso nuevo se ha formado a partir del margen del defecto. La mayor parte de las partículas no han sufrido reabsorción y se encuentran aisladas dentro del defecto. En algunas ocasiones se observan muñones de crecimiento óseo alrededor de las partículas. El hueso neoformado es todavía inmaduro, y en ocasiones une las distintas partículas entre sí.

Se ha observado que existe un cierre incompleto de los defectos en todos los casos, comenzando el crecimiento de nuevo hueso en el margen del defecto y continuándose fundamentalmente en la parte exocraneal del mismo, zona que había estado en contacto con la membrana colágena. En algunas situaciones, el crecimiento óseo desde el extremo produce una migración de las partículas hacia el centro del defecto, a veces las abarca y en otras situaciones simplemente las desplaza, como si las “empujase”. La disolución o reabsorción del material en este caso es prácticamente nula, comportándose el granulado totalmente denso de hidroxiapatita como un material inerte. Se observan centros de osificación aislados, y zonas en las que el hueso comienza a formarse alrededor de las partículas, en ambos casos de forma ortotópica. Apenas existe unión de las distintas partículas entre

sí gracias al nuevo hueso formado, pero en las situaciones en las que sí lo hace, lo hace en “forma de mosaico”, manteniendo las partículas aisladas sin haber sufrido apenas disgregación y sin presencia de vasos sanguíneos en su interior tal y como se observa en la Fig. 3.44 que se muestra a continuación.

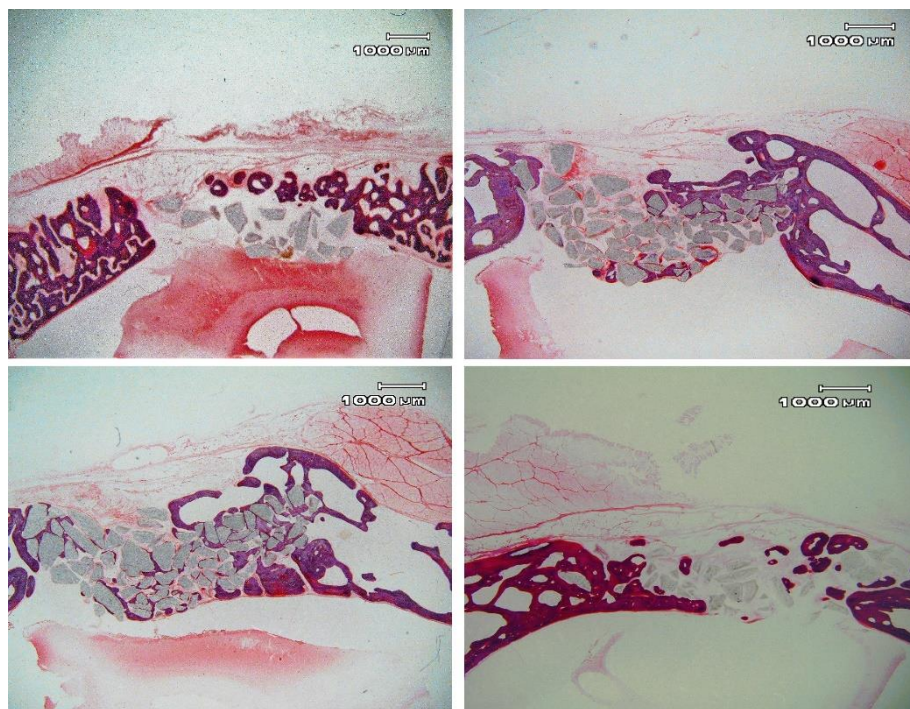


Fig. 3.44: Imágenes de diversos cortes sagitales de defectos regenerados con hidroxipatita densa transcurridas 16 semanas. Se observa cómo la formación de hueso comienza en los extremos del defecto y, en ocasiones, con muñones de formación ósea en el centro del defecto formados a partir del hematoma inicial. Con mayor frecuencia, la formación de hueso es más notable en la parte exocraneal que en la endocraneal. El material remanente apenas ha sufrido disgregación. Se observan algunos puentes óseos entre el hueso que rodea las partículas, uniéndolas entre sí, aunque esta circunstancia es infrecuente.

La osificación alrededor de las partículas, en ocasiones, se produce a partir de un tejido conectivo denso que precede la formación de osteoide y, por tanto, de hueso, como si de una osificación endocondral

se tratara (Fig. 3.45). Este hecho concuerda con los reportado por Kuboki et al. (2001), quién afirmó que con materiales de porosidad de reducido tamaño (entre 90 y 110 μm), se produce una osificación endocondral, es decir, la formación de hueso a partir de tejido cartilaginoso (7). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo contrastan con los mostrados por el mismo autor en un trabajo anterior, de 1998, en el que observó que rodeando partículas totalmente densas solamente había tejido conectivo fibroso, sin presencia de hueso ni cartílago; pero en esta ocasión se estaba determinando la capacidad de dicho material de formar hueso ectópicamente (328). A partir de estos resultados se puede deducir que alrededor de partículas densas, con ausencia de porosidad, se puede formar hueso de forma ortotópica, pero no de forma ectópica.

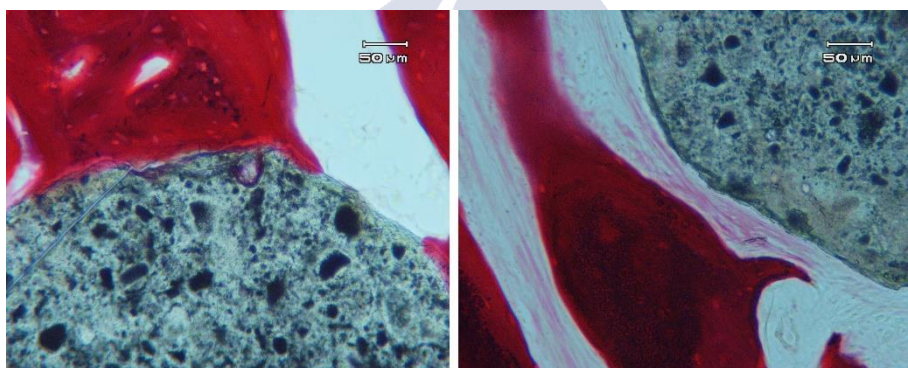


Fig. 3.45: Imágenes a mayor aumento que muestran cómo se produce, con mayor frecuencia, la aposición directa del hueso neoformado sobre las partículas de material. En ocasiones, se interpone un tejido conectivo denso que, posteriormente mineraliza para formar un osteoide que precede la formación de hueso. Se puede afirmar que se pasa de una situación de “fijación morfológica” (imagen de la derecha) a una situación de “fijación biológica” (imagen de la izquierda) (301).

3.2.2.3.2- Granulado denso de β -TCP

A partir del estudio histológico de las láminas delgadas realizadas de las muestras tomadas de los defectos regenerados con β -fosfato tricálcico en forma de granulado totalmente denso, se han obtenido las siguientes observaciones.

Al igual que con el material hidroxiapatita, no se han observado reacciones infecciosas, inflamatorias o de encapsulación del material. La formación de hueso nuevo comenzó a partir de los márgenes del defecto para continuarse hacia el centro por la zona exocraneal del mismo, al igual que sucedió en los defectos regenerados con hidroxiapatita densa. En ninguna ocasión ha tenido lugar el cierre completo del defecto, y generalmente, éste ha continuado su crecimiento sin abarcar las partículas de material. En algunas situaciones, sí se ha depositado hueso directamente sobre las partículas, formando muñones de crecimiento óseo que han comenzado en zonas centrales del defecto sin contacto con los márgenes. Este evento, está asociado a la mayor disolución del β -TCP que, por un lado produce la presencia de iones en el medio, lo que favorece la diferenciación osteoblástica, y por otro, la disgregación de la superficie incrementa su área superficial, lo que favorece la colonización de la misma por células y proteínas.

El hueso neoformado es un hueso trabecular inmaduro, en esta ocasión tanto en el margen del defecto como en los muñones de crecimiento de la zona central. La membrana barrera ya se ha reabsorbido por completo dejando a su paso tejido conectivo y periostio estructurado. (Fig. 3.46 y Fig. 3.47)



Fig. 3.46: Lámina delgada a partir de un corte horizontal de un defecto regenerado con granulado denso de β -TCP. La mayor parte de las partículas han sufrido una gran disgregación, observándose en su lugar un tejido conectivo fibroso denso, y en algunas situaciones centros de osificación. El hueso neoformado es un hueso inmaduro, sin estructura trabecular. En el margen del defecto, este hueso une las partículas de material entre sí, pero en la zona central, el hueso presente solamente rodea las partículas.

El material denso de β -TCP ha sufrido una mayor reabsorción que las partículas densas de HA, aunque ésta ha sido menor que para el material comercial KeraOs®. Algunas partículas se conservan rodeadas de hueso neoformado y con una morfología muy similar a la inicial; pero en su gran mayoría, se encuentran rodeadas de un halo de mayor densidad que refleja su morfología inicial y una superficie con morfología irregular, lo que muestra que su degradación tiene lugar desde la periferia al centro de las partículas. Rodeando las partículas que han sufrido mayor reabsorción, se aprecia un tejido conectivo fibroso con gran actividad angiogénica que precede la neoformación ósea (Fig. 3.48). En este caso, la bioactividad mostrada por el granulado denso de β -TCP ha sido mayor que la mostrada por el biomaterial denso

de hidroxiapatita, mostrando una mayor degradación a pesar de tratarse en ambos casos de materiales totalmente densos, lo que muestra que la disolución fisicoquímica tiene un papel fundamental en la reabsorción del material, y que, ésta no es solamente dependiente de la actividad osteoblástica. La importancia de la composición química en la disolución de un material, ha sido comprobado con anterioridad por diversos autores, pero siempre con materiales que contenían algún porcentaje de porosidad en su estructura (268).

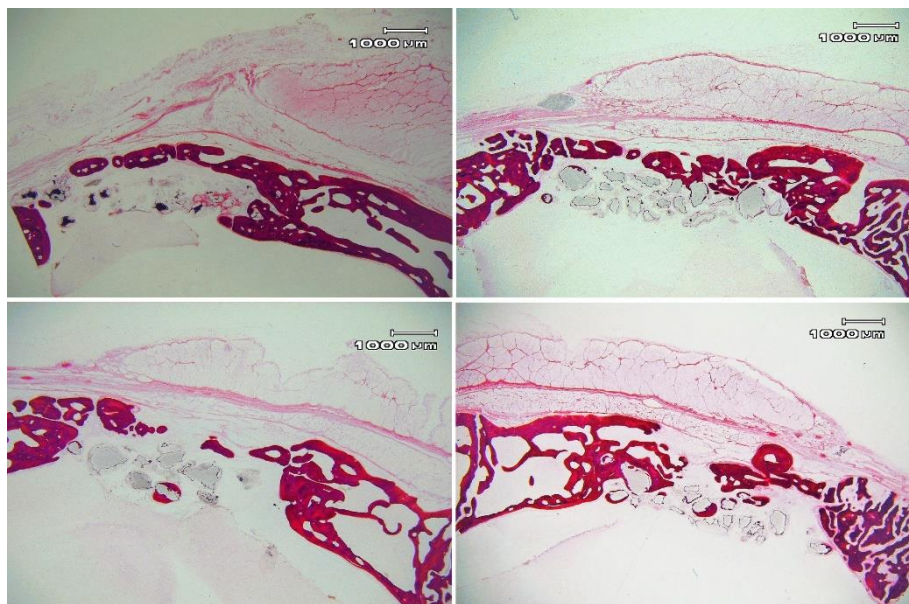


Fig. 3.47: Imágenes de láminas delgadas que muestran cortes sagitales de diferentes defectos. Se observa cómo la formación de hueso comienza en los extremos del defecto y, en ocasiones, con muñones de formación ósea en el centro del defecto formados a partir del hematoma inicial. Con mayor frecuencia, la formación de hueso se completa antes en la parte exocraneal que en la endocraneal. El material remanente apenas ha sufrido disgregación. En ocasiones se forman puentes óseos entre el hueso que rodea las partículas, uniéndolas entre sí.

En el interior de las partículas no se observa la presencia de vasos sanguíneos, debido a la ausencia de porosidad. Un hecho similar había sido observado por Ghanaati et al. (2010), en implantes de β -TCP que

poseían una baja microporosidad, en las que el hueso unía las partículas rodeándolas en “forma de mosaico” (329).

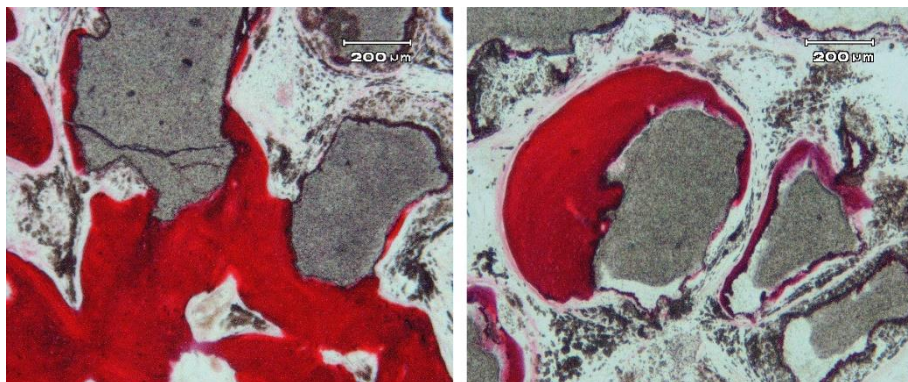


Fig. 3.48: Imágenes a mayor aumento de partículas de material denso de β -TCP. El hueso nuevo se ha depositado directamente sobre el material, sin interposición de tejido fibroso ni encapsulación del mismo. Se observa la degradación de las partículas, quedando éstas con una morfología irregular, y pasando parte del material disgregado al tejido blando.

3.2.2.4- Biomateriales porosos

3.2.2.4.1- Granulado poroso de HA

Del mismo modo que se procedió con anterioridad, se realizó el estudio histológico de los agujeros regenerados con el material de porosidad controlada confeccionado a partir del polvo de HA, transcurridas 16 semanas desde su implantación.

En esta ocasión, tampoco se han observado reacciones infecciosas, inflamatorias o de encapsulación del material. Los defectos han sido regenerados a través del cierre completo de los mismos, con formación de hueso nuevo. Este hueso se ha formado a partir de los extremos del defecto, para aposicionarse directamente sobre el material, e incluso formarse en el interior de este. Transcurridos 4 meses, el hueso del extremo de los defectos es un hueso maduro, que presenta remodelado

haversiano, observándose la línea cemental que separa osteones primarios y secundarios. En zonas centrales del defecto, el hueso también es en su mayoría maduro, aunque en algunas zonas más próximas al material, o incluso aquel que se ha formado en el interior del material, es todavía inmaduro. Con presencia de lagunas osteocitarias de mayor volumen. (Fig. 3.49)

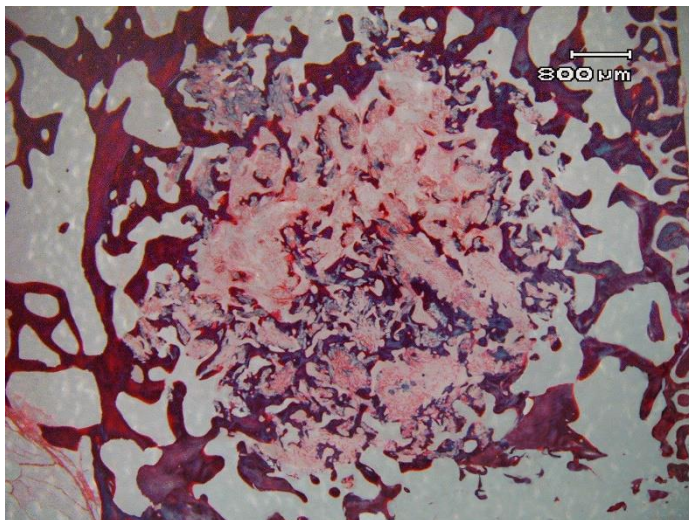


Fig. 3.49: Lámina delgada a partir de un corte horizontal de un defecto regenerado con granulado poroso de HA transcurridas 16 semanas desde su implantación. La formación de hueso tiene lugar a partir de los extremos del defecto, y se va trasladando hacia el centro del mismo, abarcando las partículas de material. Éstas han sufrido una leve disgregación, dejando en su lugar un tejido fibroso denso que contiene núcleos de hueso nuevo y de aglomerados formados por hueso y material, que posteriormente se van uniendo entre sí gracias al crecimiento de hueso nuevo. Sobre aquellas partículas de menor porosidad, el hueso se aposiciona directamente sobre el material. Las partículas con mayor porosidad e interconexión entre los poros han sufrido una reabsorción mayor y una formación de hueso nuevo y de vasos sanguíneos en su interior, además de en su superficie.

El periostio y el endostio están perfectamente estructurados, ya no se observan restos de la membrana colágena, pues ha sufrido una reabsorción completa tras 4 meses desde su implantación.

Ha tenido lugar una “incorporación” del material por el hueso nuevo, estableciéndose una unión entre el material y el hueso de modo que comparten estructura y fisiología, comportándose biomecánicamente como un todo. Este concepto de unión entre hueso y material fue denominado por Hench en el año 1991 “fijación bioactiva” (301) (Fig. 3.50).

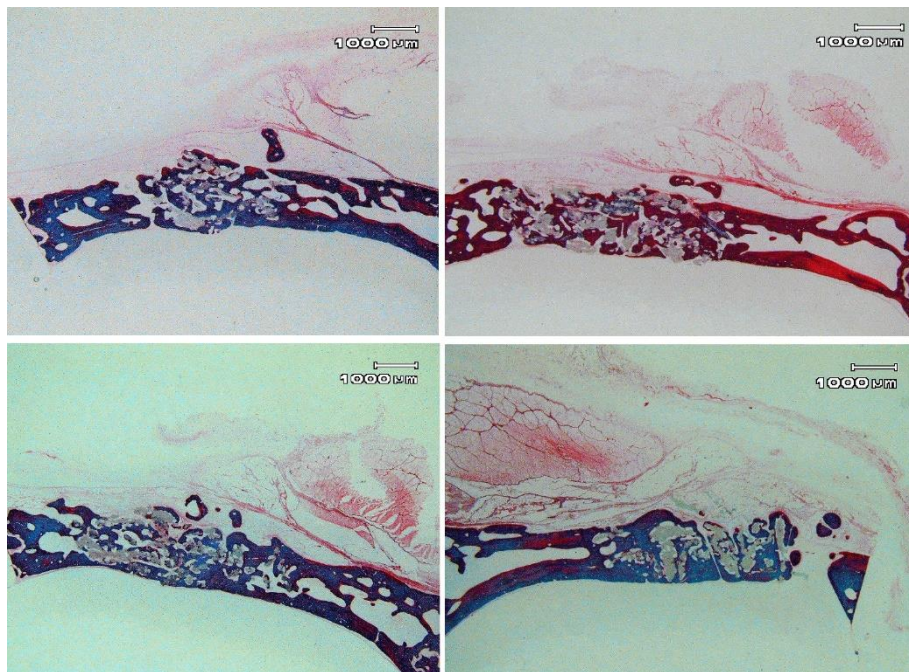


Fig. 3.50: Imágenes de láminas delgadas obtenidas a partir de cortes sagitales de los defectos regenerados con HA porosa. Se observa cómo se ha producido un cierre completo del defecto en todos los casos, tanto en la zona endocraneal como en la exocraneal. El periostio está perfectamente estructurado. Se observan las partículas de material remanente que apenas han sufrido reabsorción. El hueso neoformado que las une presenta un grosor mayor que en el caso del material denso, cubriendo todo el volumen del defecto. La estructura de este hueso es la que corresponde a un hueso compacto, que apenas contiene trabéculas óseas.

El material de HA con porosidad del 47% ha sufrido una degradación mayor que en caso del material denso, pero todavía se pueden distinguir perfectamente las partículas de material del hueso

después de 4 meses desde su implantación. Esto coincide con lo reportado por Sun et al. (2009), quién indicó que la macroarquitectura de HA con porosidad del 75% apenas sufría modificaciones transcurridos 3 meses desde su implantación, la neoformación ósea se adapta a su morfología produciendo fundamentalmente hueso lamelar sobre la estructura del material (290). También Figliuzzi et al. (2016), observó formación de hueso lamelar directamente sobre partículas de HA (217).

En el interior de los poros presentes en las partículas, se ha formado hueso nuevo. En las interconexiones que hay entre los distintos poros, se aprecia cómo ha tenido lugar la angiogénesis, que favorece el aporte de nutrientes y oxígeno a los centros de osificación aislados que no se forman a partir del margen del defecto (Fig. 3.51, Fig. 3.52 y Fig. 3.53).

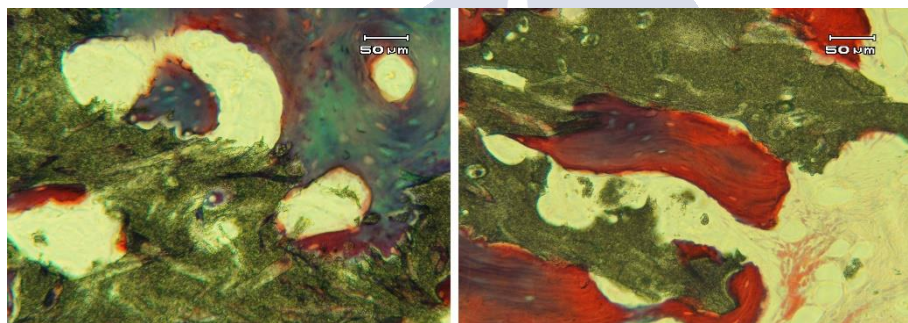


Fig. 3.51: Imágenes de las láminas delgadas a mayor aumento en las que se aprecia cómo el hueso se forma directamente sobre el material, sin interposición de tejido fibroso. El hueso, en esta situación, es un hueso maduro que presenta un remodelado haversiano, tal y como muestra la osteona que se puede observar en la parte superior derecha de la imagen de la izquierda. El material apenas ha sufrido disgregación y no se observa presencia de este a la médula o al tejido blando.

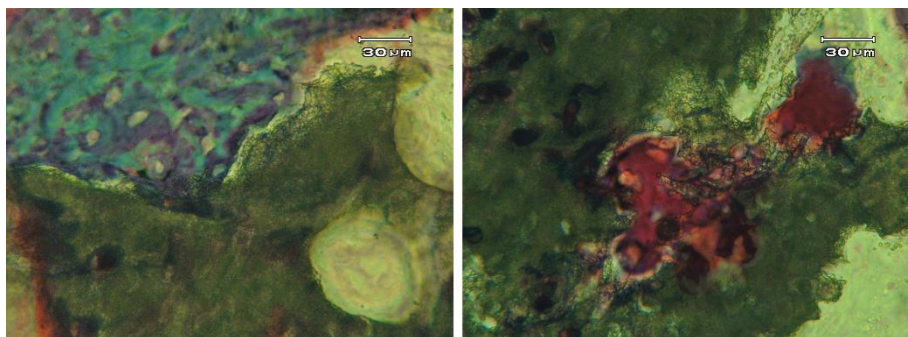


Fig. 3.52: En estas imágenes se aprecia cómo el hueso se forma también en el interior de los poros de mayor tamaño del material gracias a la vascularización que llega a partir de los vasos que recorren las partículas a través de los poros de un tamaño menor. En esta situación se observa un hueso inmaduro, con gran contenido celular y lagunas osteocitarias distribuidas al azar; por otra parte, su mineralización es escasa.

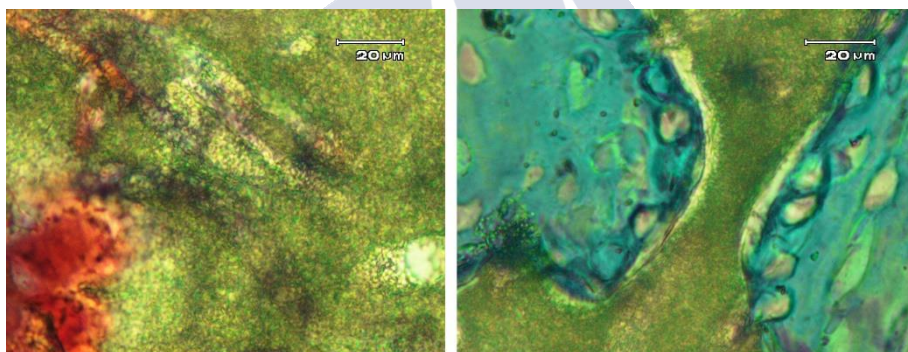


Fig. 3.53: Fotografías de gran aumento en las que se aprecia cómo los vasos sanguíneos se han formado en las cavidades que han permanecido en el material a partir de la calcinación de las fibras de algodón; a través de estos vasos neoformados se nutre el hueso nuevo que se forma en el interior del material (imagen de la izquierda). En la imagen de la derecha se observan los osteoclastos próximos a la superficie del material, que se muestran como células multinucleadas con citoplasma de gran tamaño. Estas células destruyen el material para permitir en su lugar la formación de hueso nuevo. Se observa una estrechez en la partícula del material rodeada por los osteoclastos debida a la actividad de dichas células.

3.2.2.4.2- Granulado poroso de β -TCP

A partir del estudio histológico de las láminas delgadas obtenidas de las muestras de los defectos regenerados con β -TCP con porosidad del 46%, se ha determinado que, con este material, tampoco se han sucedido reacciones inflamatorias, infecciosas ni de encapsulación del mismo; a pesar de que en este caso el material ha sufrido una degradación muy acusada y, en algunas láminas, los restos de este son casi imperceptibles (Fig. 3.54).

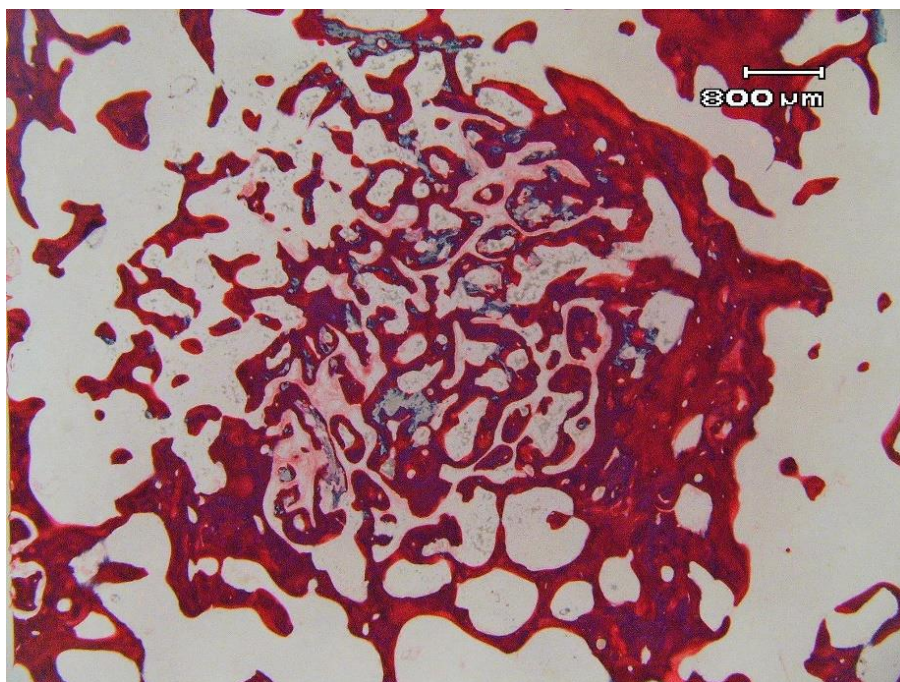


Fig. 3.54: Imagen de un corte horizontal de un defecto regenerado con material poroso de β -TCP confeccionado en la presente tesis doctoral. Se observa cómo se ha producido un cierre completo del defecto por hueso neoformado. La presencia de material ha disminuido considerablemente, y las partículas de material remanente muestran un elevado grado de reabsorción y están cubiertas de hueso nuevo.

En rasgos generales, se observa cómo, a la disgregación del biomaterial, le ha seguido una formación de hueso que ha provocado un cierre completo de los defectos en la totalidad de los casos tanto en la zona endocraneal como en la exocraneal. Esto refleja lo que en la literatura se denomina una situación de reemplazo (301), en la que la degradación de material fue sustituido por hueso nuevo. Lo importante en esta situación es que el ratio de reabsorción y la velocidad de formación de hueso estén equiparados. De todos modos, es necesario precisar si la cantidad y la calidad del hueso neoformado son las deseables para las demandas biomecánicas que se requieren del tejido, pues macroscópicamente muestra una estructura ósea trabeculada. En los defectos regenerados con material de hidroxiapatita con un 47% de porosidad, como ya se ha mencionado, el hueso presenta una estructura que se corresponde con un hueso más compacto. Sun et al. (2009), había observado que tras la implantación de cilindros con un 75% de porosidad de HA y β -TCP tenía lugar la formación de hueso lamelar sobre la HA sin modificar apenas su estructura. Para el β -TCP observó que la degradación de la macroarquitectura del cilindro daba lugar a su integración con el trabeculado del hueso esponjoso. Podemos afirmar que, con el granulado poroso, el patrón de formación de hueso nuevo sucede del mismo modo que lo referido por dicho autor (290) (Fig. 3.55).

El hueso neoformado, microscópicamente presenta una estructura de hueso primario, que rodea los restos de partículas remanentes pero no presenta una estructura haversiana, sino que las fibras de colágeno se encuentran desordenadas. También se observa una presencia mayor de células y lagunas osteocitarias de gran tamaño (Fig. 3.56 y Fig. 3.57).

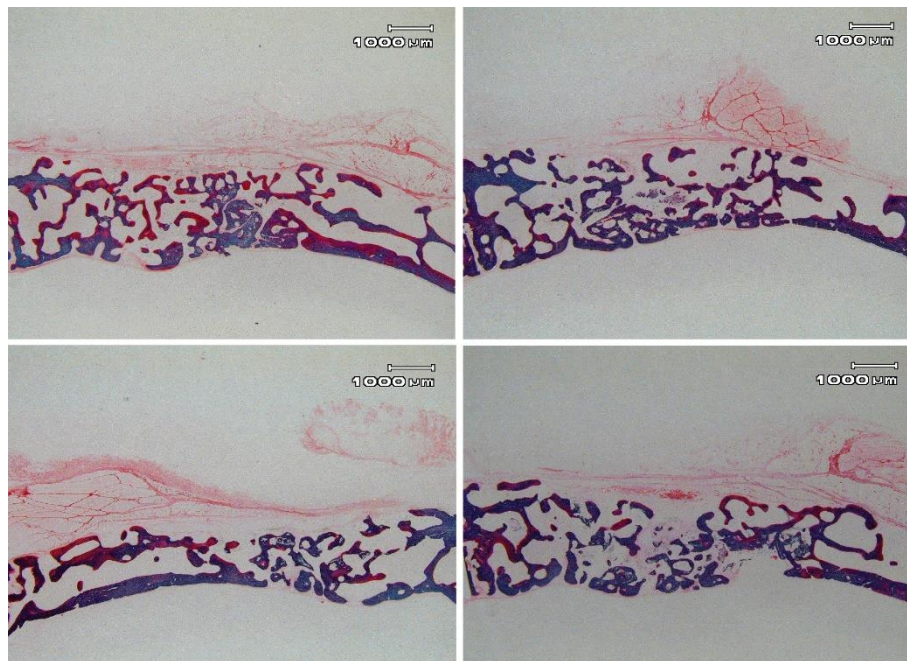


Fig. 3.55: Láminas delgadas obtenidas a partir de cortes sagitales de los defectos óseos en los que se ha introducido β -TCP con una porosidad del 46%. Se observa el cierre completo de los defectos con formación de hueso nuevo que presenta una estructura trabeculada. Los restos de material remanente son escasos, y muestran que éste ha sufrido una gran reabsorción transcurridas 16 semanas.

La disgregación de material ha provocado la presencia de sus productos de desecho en el tejido óseo o incluso en zonas de la médula ósea (Fig. 3.58). Esta disgregación ha sido mayor que en cualquier material de hidroxiapatita empleado (Bio-Oss®, HA densa e HA de igual porosidad y distribución de poros), hecho que concuerda con lo referido en la literatura hasta el momento (201,242). Pero cabe mencionar, que la degradabilidad del material poroso de β -TCP fabricado también fue mayor que para los otros materiales de β -TCP empleados en el presente trabajo (KeraOs® y β -TCP denso). Este hecho se atribuye a la presencia de un porcentaje de porosidad mayor presente en el granulado, que fue de un 46% frente al 21.2% que contiene el material comercial KeraOs®, y la porosidad nula que contiene el granulado denso (0.6%). Otra característica diferencial es la presencia

de macroporos de entre 150 y 50 μm , que se corresponden con el 30 de la porosidad total, tipo de porosidad que el material comercial KeraOs® no posee.

En la literatura se mencionan tiempos diferentes para la reabsorción total del β -TCP. Según Ogose et al. (2005) (289), la media se sitúa en las 9 semanas (con un rango entre 4 y 16 semanas); en cambio Palti et al. (2002) afirmó que la reabsorción total de este material sin dejar residuos se produce entre los 6 y 12 meses (242). En este trabajo, se ha comprobado la importancia que tiene el papel de la porosidad en la disolución del material. Cuando fue implantado granulado sin porosidad, es decir, totalmente denso de β -TCP, la reabsorción del mismo fue muy inferior a la que se produjo con la implantación de un granulado de igual tamaño de partícula, pero con presencia de porosidad (46%). Este segundo sufrió una disolución casi completa transcurridas 16 semanas. Solamente se observan productos de desecho y restos de partículas, que han sufrido una reducción de su tamaño considerable, además de cambios en la morfología a causa de su reabsorción. Esta se produce de forma centrífuga, comenzado en la superficie externa del material y dirigiéndose hacia el interior de las partículas.

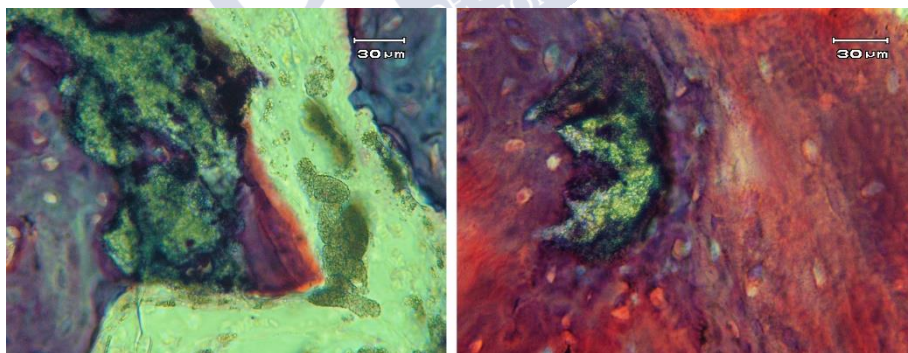


Fig. 3.56: El hueso nuevo, que muestra una unión fisiológica a las partículas de material remanente, presenta una estructura microscópica de hueso inmaduro. Los haces de las fibras colágenas se disponen de manera aleatorizada. Se observa cómo las partículas han sufrido una acusada disgregación desde la periferia, modificando notablemente su morfología.

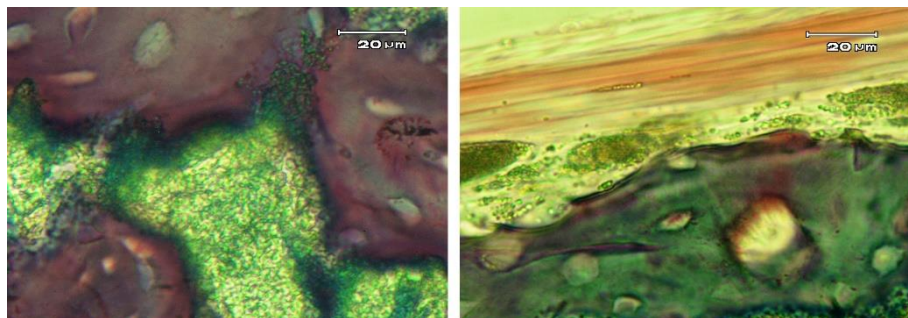


Fig. 3.57: A mayor aumento se pueden observar las lagunas osteocitarias del hueso, que presentan un gran tamaño, característica propia del hueso inmaduro. Los productos de desecho del material, además de encontrarse en la médula ósea, también se observan en el tejido blando o sus inmediaciones, como en el caso de la imagen de la derecha, en la que están bajo el periostio.

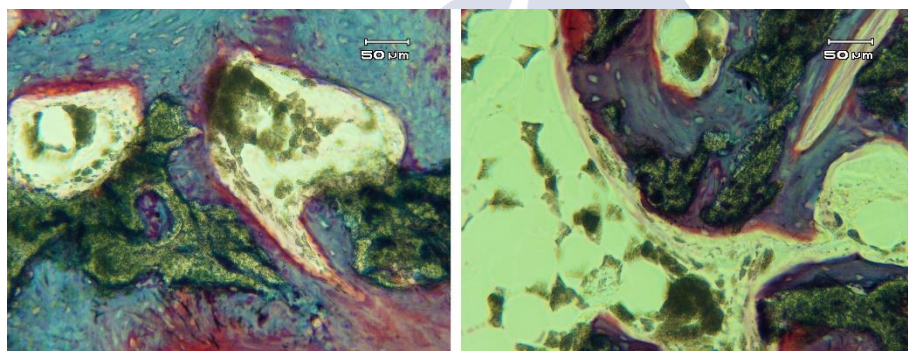


Fig. 3.58: Imágenes de las láminas delgadas a mayor aumento en las que se aprecia cómo el hueso se forma directamente sobre el material y en el interior de los poros que presenta, sin interposición de tejido fibroso. La disolución del material ha producido la presencia de sus productos de desecho en los espacios medulares.

3.2.3- HALLAZGOS HISTOLÓGICOS CUANTITATIVOS

Tal y como se ha indicado anteriormente, se ha pretendido evaluar la influencia de dos variables en la formación de hueso nuevo. Por un lado, la composición química del material, bien HA, bien β -TCP; y por otro, la estructura de este, bien totalmente DENSA, bien con POROSIDAD CONTROLADA, o bien con la POROSIDAD y superficie que presentan los MATERIALES COMERCIALES. Para ello se ha medido en cada una de las láminas delgadas obtenidas de los diferentes defectos, tras seleccionar el área concreta del defecto, el porcentaje de hueso nuevo y de material remanente.

3.2.3.1- *Análisis de la fiabilidad intraobservador*

Dado que las mediciones se han llevado a cabo por el mismo observador, para evaluar la reproductibilidad y el error intraobservador, se ha realizado la prueba ANOVA por determinación de error por alfa de Cronbach ($p \leq 0.05$), en medidas repetidas 3 veces en 10 láminas seleccionadas al azar. Los resultados han sido de un valor de alfa de Cronbach de 0.98 para el hueso y de 0.91 para el material. Estos resultados indican que existe una precisión elevada en el instrumento de medida y que la fiabilidad en los datos es excelente para las variables estudiadas, pues todos los resultados se encuentran en valores muy por encima de 0.8, valor de fiabilidad considerado aceptable para investigación (405).

3.2.3.2- *Verificación de la Distribución Normal y de la Homogeneidad de las Varianzas de las muestras*

El test de Kolmogórov-Smirnov o test de “bondad de ajuste”, fue realizado para comprobar si la distribución de la población era normal, pues la población tenía un tamaño muestral de $N \geq 20$ -30 datos por grupo, y dichos grupos eran de tamaños diferentes. También se realizó

un test para comprobar la homogeneidad de las varianzas en los grupos (test de Levene). Todas las variables medidas en los distintos grupos siguieron una distribución normal (HUESO y MATERIAL) en cada uno de los grupos (DENSO, POROSO, COMERCIAL y CONTROL), ya que el nivel de significación “p” fue mayor a 0.05 en todos los grupos para cada una de las variables estudiadas. Por otro lado, no se han encontrado diferencias significativas en las varianzas de los distintos grupos ($p \geq 0.05$), por lo tanto, se asume que dichas varianzas son homogéneas, presentando homocedasticidad.

3.2.3.3- Análisis de la Varianza

Para estudiar las variables HUESO y MATERIAL en cada uno de los grupos mencionados (DENSO, POROSO, COMERCIAL y CONTROL) y para ambos materiales (HA y β -TCP), se procedió con un análisis de la varianza (ANOVA de 1 factor) y un estudio post hoc de Scheffé. Se ha elegido el test de ANOVA de 1 factor por tratarse de la evaluación transversal de variables cuantitativas independientes y que, al seguir una distribución normal y presentar varianzas homogéneas, permiten la utilización de test paramétricos, que presentan una potencia estadística máxima para encontrar diferencias estadísticamente significativas. La prueba a posteriori de Henry Scheffé permitió conocer entre qué grupos se produjeron las diferencias significativas. Esta prueba, el más importante los tests post hoc, permite realizar estudios a posteriori cuando los tamaños de los grupos son desiguales e incluso cuando existe una falta de normalidad entre las muestras y/o una falta de homogeneidad de las varianzas.

3.2.3.2.1- Influencia de la composición química

Para determinar la influencia que tiene la composición química de los biomateriales empleados en la formación de nuevo hueso, se comparó para cada grupo de arquitectura diferente empleada: DENSO,

con POSORIDAD CONTROLADA y los MATERIALES COMERCIALES, el porcentaje de hueso presente en las láminas delgadas. Complementariamente, se ha evaluado la presencia de material remanente en cada uno de los grupos mencionados. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

3.2.3.2.1.1- Granulado denso

a. Hueso formado

La hipótesis nula empleada para contrastar en el test de Anova de 1 factor si la cantidad de hueso neoformado es desigual empleando granulados densos de composición química diferente (HA y β -TCP) después de 16 semanas desde su implantación, fue la siguiente:

- H_{01} = No existen diferencias significativas en el porcentaje de hueso neoformado entre los grupos CONTROL, HA DENSA y β -TCP DENSO.

Los porcentajes de hueso medidos en las diferentes láminas obtenidas de los defectos regenerados con los granulados densos sintetizados en el presente trabajo de investigación, así como las del grupo CONTROL, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.12: Resultados del porcentaje de hueso obtenido para el granulado denso con las composiciones químicas estudiadas y para el control.

GRUPO	POROSIDAD (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMETRO DE GRANO (mm)	HUESO (%)	SD
CONTROL	-	-	-	42.57	9.31
HA DENSA	0.6 ± 0.3	0.01	0.25-1	31.32	9.95
β -TCP DENSO	0.6 ± 0.3	0.01	0.25-1	39.93	12.20

A partir de los datos presentados en la Tabla 3.12, se observa que el porcentaje de hueso neoformado ha sido inferior en los defectos regenerados con granulado denso, que en los defectos en los que no se

ha empleado biomaterial (grupo CONTROL). El test de ANOVA de 1 factor ha verificado que existen diferencias significativas en el crecimiento de hueso entre los diferentes grupos estudiados ($p < 0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula H_{01} . El test a posteriori de Scheffé ha mostrado qué grupos son los que presentan las diferencias entre sí. No se presentaron diferencias significativas en la cantidad de hueso formado en el grupo CONTROL y en el grupo TCP DENSO ($p=0.81$); y tampoco las hay entre los grupos TCP DENSO y HA DENSA ($p=0.07$). En cambio, sí existen diferencias significativas en la cantidad de hueso formado entre el grupo CONTROL y el grupo HA DENSA ($p=0.02$).

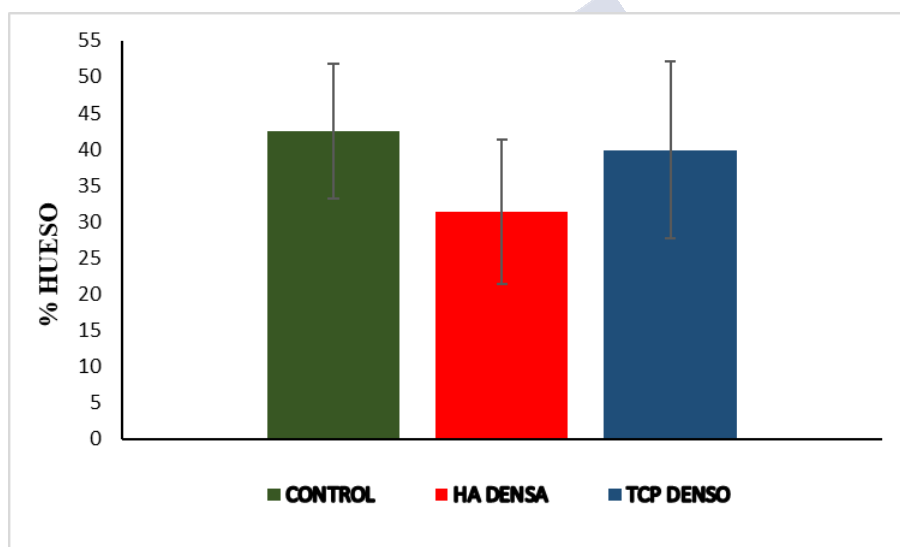


Fig. 3.59: Histograma en el que se representa el porcentaje de hueso formado empleando granulados totalmente densos de HA y β -TCP.

Estos resultados demostraron la necesidad de presencia de porosidad y/o de rugosidad superficial en los materiales que pretenden mejorar la regeneración ósea en defectos subcríticos. Empleando tanto HA como β -TCP sin presencia de porosidad, la formación de hueso no se vio favorecida; es más, el hueso se presentó en valores inferiores que en los casos en los que no se empleó ningún material de regeneración

ósea. Aun así, cabe destacar que la ausencia de porosidad perjudicó más la neoformación ósea en aquellos defectos regenerados con hidroxiapatita que en aquellos en los que se ha empleado β -TCP. Este hecho se atribuye a la mayor solubilidad del β -TCP relacionada con su composición química, concretamente la relación Ca/P. Esta disgregación del material fomenta la atracción de células osteoprogenitoras a su superficie, tanto por la presencia de iones calcio y fosfato en las proximidades del material, como por el aumento de la rugosidad superficial, que favorece posteriormente la adhesión de las mismas a su superficie (269,294). A partir de estos resultados se determinó que la reabsorción mediada por osteoclastos es menos relevante cuando se emplean materiales de β -TCP, teniendo esta un papel más importante en la reabsorción de la HA (292).

b. Material remanente

La hipótesis nula para el estudio del material remanente en el granulado denso con ambas composiciones químicas fue:

- H_{02} = No existen diferencias significativas en la cantidad de material reabsorbido en función de su composición química, bien hidroxiapatita, bien β -fosfato tricálcico, cuando se emplean granulados totalmente densos y han transcurrido 16 semanas desde su implantación.

La cantidad de material denso presente en ambos grupos se muestra en porcentajes en la tabla que figura a continuación:

Tabla 3.13: Resultado de los porcentajes de material remanente en los defectos regenerados con granulado denso después de 4 meses, y caracterización de los mismos.

GRUPO	POROSIDAD (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMTERO DE GRANO (mm)	MATERIAL (%)	SD
HA DENSA	0.6 ± 0.3	0.01	0.25-1	21.21	8.60
β-TCP DENSO	0.6 ± 0.3	0.01	0.25-1	10.26	2.36

La disgregación del granulado denso de β-TCP ha sido significativamente mayor que la del granulado denso de HA (p=0). Por lo tanto, se descartó la hipótesis nula H₀₂. Este resultado demuestra que, a pesar de la ausencia de porosidad, la disolución de β-TCP totalmente denso transcurridas 16 semanas desde su implantación, es significativamente mayor que la que sufre el material de composición química hidroxiapatita.

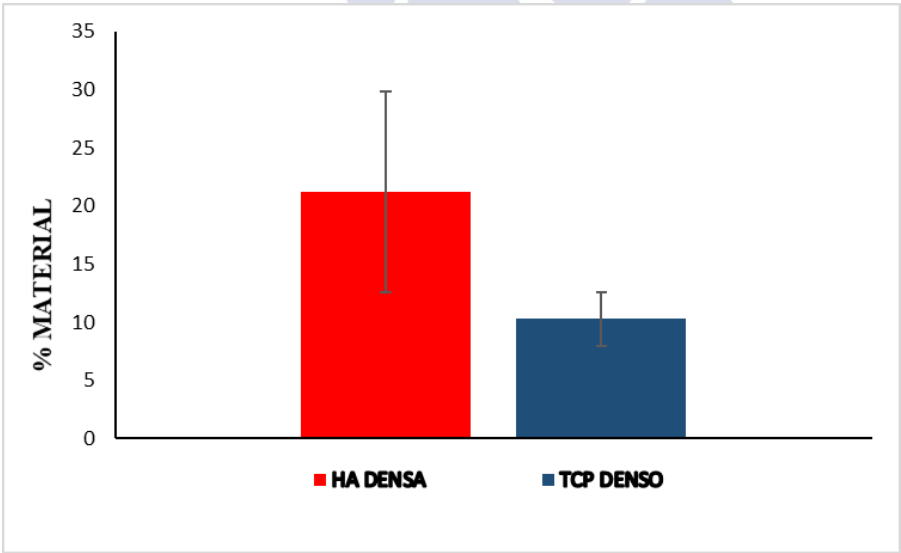


Fig. 3.60: Histograma en el que se representa el porcentaje de material remanente de los granulados totalmente densos de HA y β-TCP transcurridas 16 semanas desde su implantación.

Los resultados presentados en la Fig. 3.60 coinciden con los datos aportados por la literatura acerca de la mayor solubilidad del β -TCP (242). Es importante destacar que dicho material tiene una disgregación acusada incluso cuando no presenta porosidad ni área de superficie. En la literatura se indica que la solubilidad y/o disgregación un biomaterial se debe fundamentalmente a la composición química del mismo, en concreto a la relación Ca/P; y a la actividad celular sobre el mismo, fundamentalmente de los osteoclastos. La actividad osteoclástica viene determinada por la rugosidad de superficie del material; además de a otros factores como el pH del medio, la porosidad y tamaño de poro del material empleado... Algunos autores refieren que el papel de la microarquitectura de superficie es el primordial (294), frente a otros que indican que la actividad osteoclástica es de mayor importancia (292). Según los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede deducir que la actividad osteoclástica se ha producido del mismo modo para el β -TCP y la HA, ya que ambos materiales no presentaron ni porosidad ni área de superficie. Por lo tanto, se puede determinar que, en biomateriales con ausencia de porosidad y de superficie específica, el factor determinante para que se produzca mayor cantidad de hueso es una composición química que favorezca la mayor solubilidad del material, de acuerdo con lo reportado por Pecqueux et al. (2010) (294).

3.2.3.2.1.2- Granulado poroso

a. Hueso formado

La premisa formulada como hipótesis nula para el estudio de la cantidad de hueso neoformado en función de la composición química del granulado (HA y β -TCP) con porosidad y distribución de poros controladas e igualadas ($\pm 47\%$) después de 16 semanas desde su implantación, fue la siguiente:

- H_{03} = No existen diferencias significativas en el porcentaje de hueso neoformado en el grupo CONTROL, en el grupo HA POROSA y en el grupo β -TCP POROSO.

Los porcentajes de hueso obtenidos de las mediciones realizadas en las láminas delgadas obtenidas a partir de los defectos en los que se han empleado granulados de porosidad controlada e igualada sintetizados en el presente trabajo de investigación, así como los porcentajes de hueso formado en los defectos del grupo CONTROL, se muestran en la siguiente Tabla:

Tabla 3.14: Resultados del porcentaje de hueso obtenido con el granulado poroso confeccionado a base de las composiciones químicas estudiadas y el control.

GRUPO	POROSIDAD (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMETRO DE GRANO (mm)	HUESO (%)	SD
CONTROL	-	-	-	42.57	9.31
HA POROSA	46.7 ± 2.1	0.48 ± 0.02	0.25-1	58.62	10.68
β-TCP POROSO	45.9 ± 1.8	0.40 ± 0.01	0.25-1	43.96	6.62

A partir de los datos presentados en la Tabla 3.14, se observa que el porcentaje de hueso neoformado ha sido superior en los defectos en los que se ha empleado granulado poroso, en comparación con los defectos en los que no se ha empleado biomaterial (grupo CONTROL).

El test de ANOVA de 1 factor ha mostrado que existen diferencias significativas en la cantidad de hueso formado en los defectos en los que se han empleado los materiales de diferente composición química pero misma estructura de superficie y porosidad ($p < 0.05$). Por tanto, se rechaza la hipótesis nula planteada, H_{03} . Con el test a posteriori de Scheffé se ha determinado que entre el grupo CONTROL y el grupo β-TCP POROSO el porcentaje de hueso no ha presentado diferencias significativas ($p = 0.92$). Sin embargo, sí existieron diferencias significativas en la cantidad de hueso formado entre los grupos CONTROL y HA POROSA ($p = 0$), así como entre los grupos HA POROSA y β-TCP POROSO ($p = 0$). En el histograma representado en la Fig. 3.61, se representan gráficamente los porcentajes de hueso obtenidos para cada material y el grupo control.

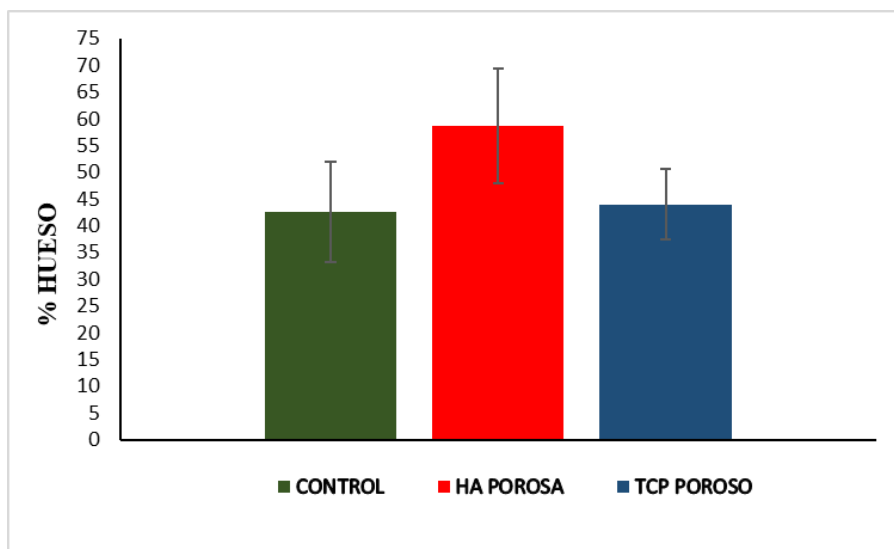


Fig. 3.61: Histograma en el que se representa el porcentaje de hueso formado empleando granulados con el porcentaje y distribución de la porosidad igualados, pero con composiciones químicas diferentes de HA y β -TCP. También se muestra el porcentaje de hueso formado en el grupo CONTROL.

La formación de hueso, en esta ocasión, fue mayor en los defectos en los que se emplearon materiales con porosidad, siendo la cantidad de hueso presente superior a la observada en el grupo CONTROL. Es importante mencionar que las diferencias no han sido estadísticamente significativas entre el grupo CONTROL y β -TCP POROSO. Con el empleo de este material, a pesar de haberse producido un cierre completo del defecto, hecho que discierne lo ocurrido en los defectos pertenecientes al grupo CONTROL, la cantidad de hueso formado es significativamente inferior al que existe en el grupo HA POROSA. Sería necesario precisar si la zona regenerada cumple con las demandas funcionales en aquellas situaciones en las que el defecto está sometido a carga. Algunos autores afirman que la degradación completa del material es una ventaja en la regeneración de un defecto en lugar de que se mantenga material entremezclado con el hueso nuevo (289), aunque si existe una unión morfológica y funcional real entre el material y el hueso, las propiedades mecánicas en la zona de regeneración podrían

ser suficientes para las demandas funcionales. Se ha reportado que el proceso de osteogénesis es diferente en función de si la composición química del sustituto óseo es HA o β -TCP. El hueso que se forma con el empleo de β -TCP es trabeculado, y el hueso que crece en torno a la HA es de tipo laminar (217,290). Quizá sea la mayor cantidad de médula ósea presente en los defectos regenerados con β -TCP, propia del hueso trabecular, motivo de un resultado inferior en el porcentaje de hueso formado.

Otra circunstancia observada en estudios previos ha sido una diferente velocidad de formación ósea para ambos materiales. Según Sun et al. (2009) en los primeros 3 meses tras la colocación de β -TCP e HA con porosidad igualada del 75%, los defectos regenerados con el primer material presentaron mayor cantidad de hueso, para igualarse a partir del cuarto mes hasta llegar a ser superior en los defectos regenerados con HA a los 12 meses (290). Los resultados mostrados en esta investigación contrastan con lo reportado por dicho autor, pues a las 16 semanas la cantidad de hueso es significativamente mayor en los defectos regenerados con HA. Las diferencias pueden ser atribuibles a la morfología del material, en la investigación llevada a cabo por Sun et al. (2009), se trataba de cilindros porosos. En cambio, en el presente trabajo de investigación, se empleó un granulado como modo de presentación del material, el cual puede tener una mayor predisposición a su disolución. Por otra parte, cabe destacar que la porosidad que presentaron los materiales empleados en esta tesis doctoral fue inferior, en torno al 47% y, aun así su disgregación fue muy elevada para ambos materiales como se puede observar en el siguiente apartado.

b. Material remanente

La hipótesis nula formulada para llevar a cabo el estudio estadístico del material remanente transcurridas 16 semanas desde la implantación del granulado poroso comercial (Bio-Oss® y KeraOs®) con ambas composiciones químicas es:

- H_{04} = No existen diferencias significativas en la cantidad de material remanente después de 16 semanas desde su implantación, en función de su composición química, bien hidroxiapatita, bien β -fosfato tricálcico, cuando ambos materiales presentan la misma porosidad.

Los porcentajes de material poroso que permaneció en ambos grupos después del transcurso de 16 semanas se muestran en la Tabla 3.15:

Tabla 3.15: Resultado de los porcentajes de material remanente en los defectos regenerados con granulado poroso y características de dichos materiales.

GRUPO	POROSIDAD (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m^2/g)	DIÁMTERO DE GRANO (mm)	MATERIAL (%)	SD
HA POROSA	46.7 ± 2.1	0.48 ± 0.02	0.25-1	9.46	6.06
β -TCP POROSO	45.9 ± 1.8	0.40 ± 0.01	0.25-1	2.15	1.56

La disgregación del granulado poroso de β -TCP ha sido significativamente mayor que la sufrida en el granulado poroso de HA ($p=0$), resultado representado en la Fig. 3.62 que aparece a continuación. A partir de dicho resultado, se descarta la hipótesis nula H_{04} .

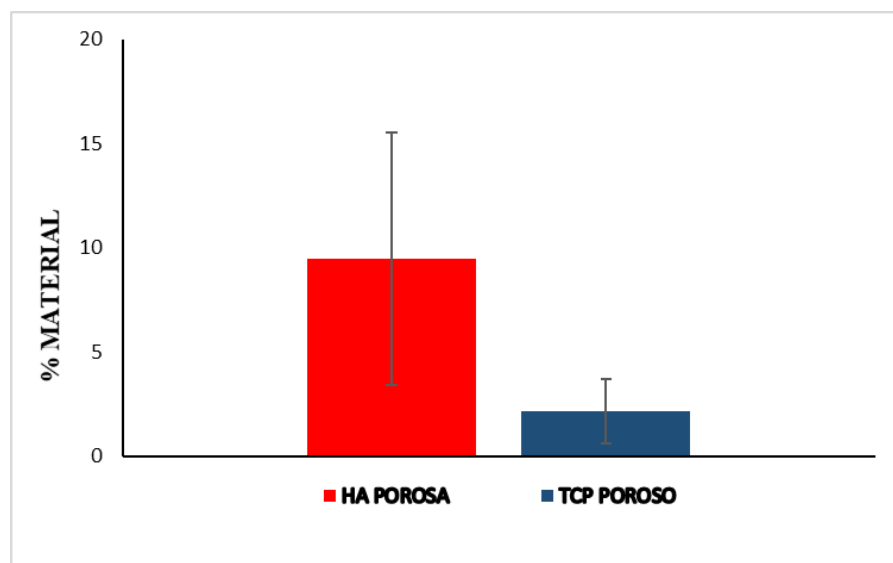


Fig. 3.62: Histograma en el que se representa el porcentaje de material remanente empleando granulados con porosidad y distribución de poros igualadas de HA y β -TCP transcurridas 16 semanas desde su implantación.

A partir de los resultados obtenidos, se ha comprobado que cuando dos materiales de composiciones químicas diferentes, HA y β -TCP, presentan el mismo porcentaje de porosidad y la misma distribución de poros, la reabsorción es mayor en el granulado que presenta la composición química β -TCP. La reabsorción de ambos materiales ha sido muy acusada, aun así, la diferencia entre ambos ha sido significativa. Se aprecia cómo el granulado de β -TCP prácticamente ha desaparecido una vez transcurridas 16 semanas desde su implantación. Este hecho coincide con lo referido en la literatura por diversos autores (266,282,289–292,404). Los tiempos de reabsorción total del material reportados en los distintos estudios no son coincidentes, aunque habitualmente se sitúan en las 8 y 16 semanas. Los factores que determinan este tiempo son la cantidad de poros y el tamaño de los mismos. En esta ocasión, se puede afirmar que un granulado de β -TCP con el 46% de porosidad, transcurridas 16 semanas desde su implantación, presenta una reabsorción casi completa.

3.2.3.2.1.3- Granulado comercial

a. Hueso formado

La hipótesis nula formulada para evaluar la cantidad de hueso neoformado en función de la composición química del granulado comercial con diferentes porosidades y composiciones químicas (KeraOs® -21.2%- y Bio-Oss® -55.6%-), fue la siguiente:

- H_{05} = No existen diferencias significativas en el porcentaje de hueso neoformado en el grupo CONTROL, en el grupo HA COMERCIAL, y en el grupo β -TCP COMERCIAL.

Los porcentajes de hueso neoformado medidos en las láminas obtenidas de los defectos regenerados con los materiales comerciales empleados (KeraOs® y Bio-Oss®) y en las láminas del grupo CONTROL, se presentan en la Tabla 3.16:

Tabla 3.16: Resultados del porcentaje de hueso obtenido para las composiciones químicas estudiadas en los materiales comerciales y en el grupo control, y caracterización de dichos materiales.

GRUPO	POROSIDAD	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMTERO DE GRANO (mm)	HUESO (%)	SD
CONTROL	-	-	-	42.57	9.31
HA COMERCIAL (BIO-OSS®)	55.6 ± 0.4	84.53 ± 4	0.25-1	46.93	8.29
β -TCP COMERCIAL (KERAOS®)	21.2 ± 1.9	0.28 ± 0.03	0.25-1	56.42	13.09

Según los datos presentes en la Tabla 3.16, se aprecia que el porcentaje de hueso neoformado ha sido superior en los defectos regenerados con los biomateriales comerciales, que en los defectos en los que no se ha empleado ningún material (grupo CONTROL). La prueba de ANOVA de 1 factor ha mostrado que existen diferencias significativas entre algunos de los grupos ($p < 0.05$); por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula H_{05} . El test a posteriori de Scheffé, ha

determinado que no existen diferencias significativas en la cantidad de hueso formado en el grupo CONTROL y en el grupo HA COMERCIAL ($p=0.643$); y tampoco las hay entre el grupo HA COMERCIAL y el grupo β -TCP COMERCIAL ($p=0.199$). Sin embargo, sí se presentan diferencias significativas en la cantidad de hueso formado entre los grupos β -TCP COMERCIAL y CONTROL ($p=0.02$).

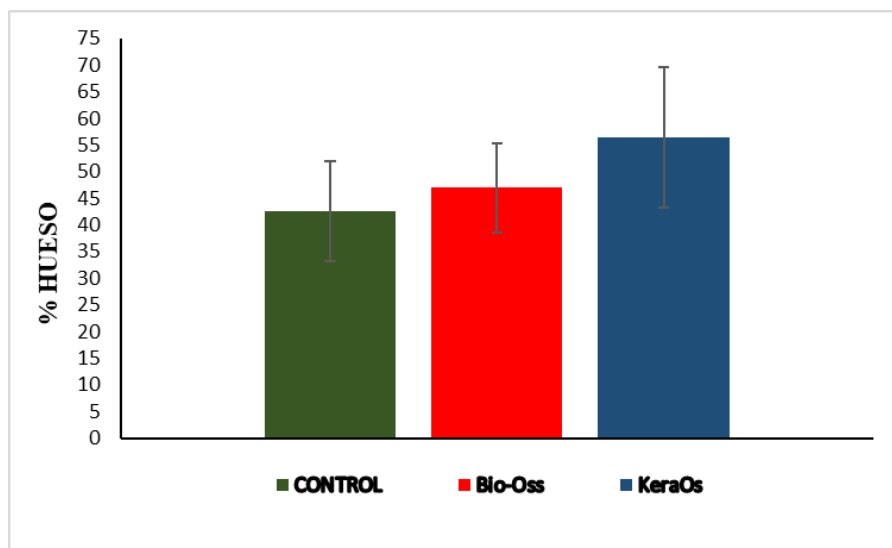


Fig. 3.63: Histograma en el que se representa el porcentaje de hueso formado empleando granulados de porosidad y distribución de poros igualadas de HA y β -TCP y el grupo CONTROL.

Tras cuantificar la cantidad de hueso en los grupos HA COMERCIAL y β -TCP COMERCIAL y compararlos entre sí y con el grupo control, se observó que tuvo lugar una formación de hueso más acusada en los defectos regenerados con los materiales comerciales que en aquellos en los que no se ha empleado ningún biomaterial. La cantidad de hueso fue significativamente mayor para el material KeraOs® que para el material Bio-Oss®. En un estudio realizado anteriormente en el ICG, también se encontraron mejores resultados en la formación de hueso en las primeras 4 semanas para KeraOs®, resultados que se mantuvieron hasta la semana 32 (404), reduciéndose dichas diferencias a la semana 56, pero manteniéndose más elevada la

fracción de hueso para los defectos regenerados con KeraOs®. En la mayor parte de las investigaciones se han obtenido mejores resultados en la cantidad de hueso formado en las primeras semanas tras su implantación para los materiales compuestos por β -TCP, pues gracias a su bioactividad, su osteoconducción se produce de forma muy temprana, a los 4 días (275). Sin embargo, algunos autores encontraron que tras el transcurso del tiempo, la cantidad de hueso se igualó cuando se emplearon ambos materiales, incluso fue mayor en los grupos regenerados con HA tras 12 meses desde su implantación (290), lo que contrasta con los resultados obtenidos por Martínez et al. (2015) (404). En esta circunstancia es de vital importancia la reabsorción ósea que se produce tras la regeneración durante el primer año, que es más acusada y rápida en los defectos regenerados con β -TCP, que en los defectos regenerados con HA o deproteinated bovine bone (DBB) (286).

b. Material remanente

La hipótesis nula formulada para llevar a cabo el estudio estadístico del material remanente en los granulados comerciales con diferente composición química es:

- H_{06} = No existen diferencias significativas en la cantidad de material remanente en los materiales comerciales Bio-Oss® y KeraOs® transcurridas 16 semanas desde su implantación.

Los porcentajes de material remanente en ambos grupos comerciales se muestran en la Tabla 3.17:

Tabla 3.17: Resultado de los porcentajes de material remanente en los defectos regenerados con granulados comerciales Bio-Oss® y KeraOs® y su caracterización:

GRUPO	POROSIDAD	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMTERO DE GRANO (mm)	MATERIAL (%)	SD
HA COMERCIAL (BIO-OSS®)	55.6 ± 0.4	84.53 ± 4	0.25-1	20.33	6.78
β-TCP COMERCIAL (KERAOS®)	21.2 ± 1.9	0.28 ± 0.03	0.25-1	10.18	4.07

La disgregación del granulado poroso comercial de β-TCP (KeraOs®) ha sido significativamente superior que la sufrida por el granulado poroso comercial de HA (Bio-Oss®) ($p=0$). A partir de este resultado, se descarta la hipótesis nula H_{06} . El resultado obtenido muestra que, a pesar de que el granulado poroso de HA presentó mayor porosidad (55.06% frente 21.2%), su reabsorción ha sido muy inferior. Este hecho demuestra la intervención de la composición química en la disolución de un material implantado en un ser vivo. En la figura que se observa a continuación, se representan dichos porcentajes de material remanente en un histograma.

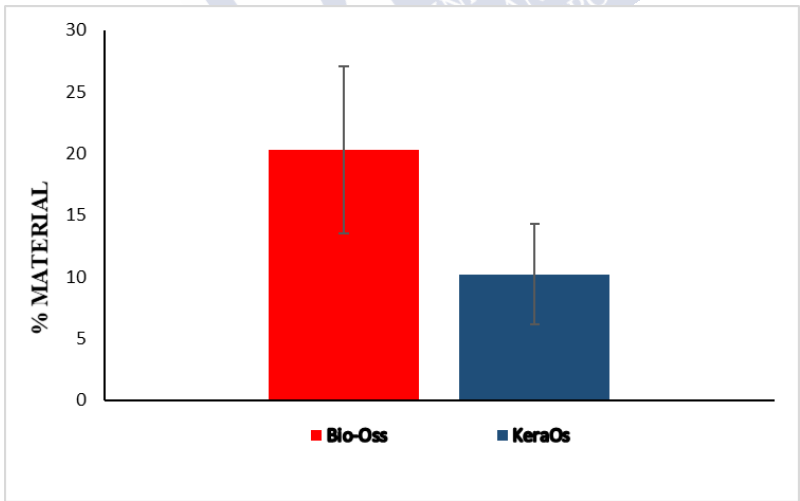


Fig. 3.64: Histograma en el que se representa el porcentaje de material remanente de los materiales comerciales Bio-Oss® y KeraOs® transcurridos 4 meses desde su implantación.

Del mismo modo que ha sucedido con los granulados anteriores, el material comercial compuesto por β -TCP (KeraOs®), ha sufrido una reabsorción mucho mayor que el material de composición química HA (Bio-Oss®). En esta ocasión, es importante remarcar que el granulado comercial de β -TCP posee una porosidad y un área de superficie muy inferior a la del DBB, tal y como se muestra en la Tabla 3.17. En el caso de la HA comercial, se trata de hueso bovino desproteínizado a partir de su sometimiento a productos químicos y calor. Su tasa de reabsorción es todavía inferior a la de la HA sintética. Algunos autores encontraron actividad osteoclástica sobre la superficie de las partículas de hueso bovino transcurridos 4 años desde su implantación, e incluso restos de material después de 10 años (188,189).

3.2.3.2.2- Influencia de la porosidad y de la superficie específica

3.2.3.2.2.1- Hidroxiapatita

a. Hueso formado

Se ha estudiado la cantidad de hueso formado con los materiales de hidroxiapatita anteriormente mencionados (DENSO, POROSO y COMERCIAL). Como ya se ha explicado, estos materiales presentan como características comunes el diámetro de grano (entre 0.25 y 1 mm) y la composición química (hidroxiapatita de pureza $\geq 95\%$). Las diferencias entre los mismos radican en su porosidad y en su estructura de superficie, los cuales se especifican en la Tabla 3.18.

Tabla 3.18: Resultados del porcentaje de hueso obtenido con los diferentes granulados de composición química HA y el grupo control.

GRUPO	POROSIDAD	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMETRO DE GRANO (mm)	% HUESO	SD
CONTROL	-	-	-	42.57	9.31
HA DENSA	0.6 ± 0.3	0.01	0.25-1	31.32	9.95
HA POROSA	46.7 ± 2.1	0.48 ± 0.02	0.25-1	58.62	10.68
HA COMERCIAL (BIO-OSS®)	55.6 ± 0.4	84.53 ± 4	0.25-1	46.93	8.29

La hipótesis nula seguida para establecer las diferencias en la formación de hueso empleando los diferentes materiales de hidroxiapatita fue:

- H₀₇: No existen diferencias significativas en la cantidad de hueso formado en los grupos CONTROL, HA DENSA, HA POROSA y HA COMERCIAL.

El test de ANOVA de 1 factor ha mostrado que existen diferencias significativas en el porcentaje de hueso presente en los defectos regenerados con los distintos granulados de composición química hidroxiapatita empleados en esta investigación ($p < 0.05$). Por consiguiente, se rechaza la hipótesis nula H₀₇. Con el test post hoc de Scheffé se ha determinado cuáles son los grupos que presentan diferencias entre sí y se especifican a continuación. Los resultados obtenidos mostraron que existieron diferencias significativas en la cantidad de hueso formado entre el GRUPO CONTROL y el GRUPO HA DENSA, siendo significativamente inferior el hueso presente en el segundo grupo ($p = 0.027$). También se presentaron diferencias significativas en la formación ósea entre los grupos CONTROL y HA POROSA, siendo significativamente superior en el segundo grupo ($p = 0.001$). Sin embargo, no existen diferencias significativas en la cantidad de hueso neoformado entre los grupos CONTROL y HA COMERCIAL ($p = 0.805$), a pesar de ser esta inferior en el primer grupo. En la cantidad de hueso presente en los defectos regenerados con los diferentes materiales, presentaron diferencias significativas los grupos HA DENSA y HA POROSA ($p = 0$) y los grupos HA DENSA y HA

COMERCIAL ($p=0.006$), siendo mayor el hueso presente en los segundos. Las diferencias en el hueso presente en los grupos HA POROSA y COMERCIAL no presentaron significación estadística ($p=0.077$).

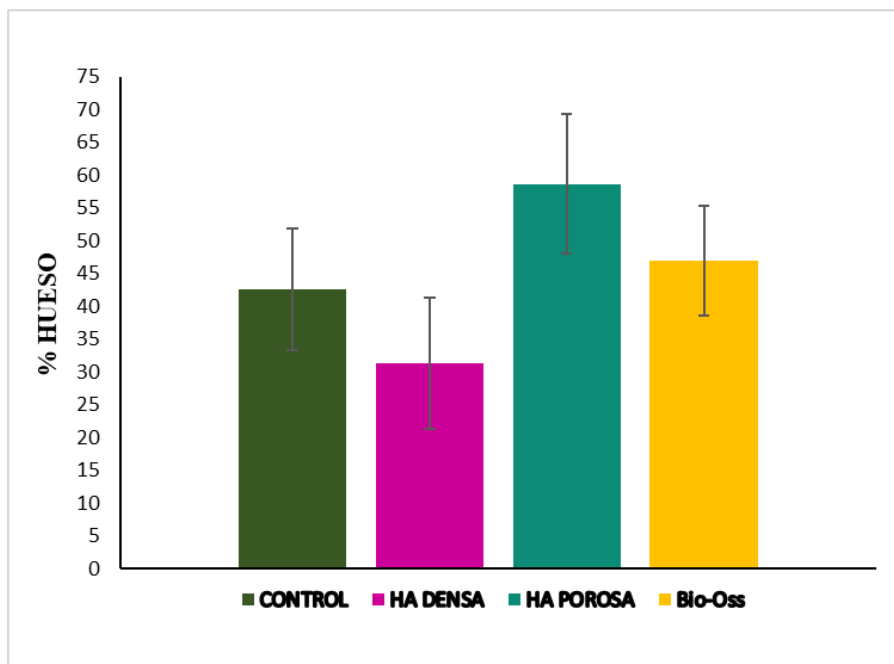


Fig. 3.65: Histograma en el que se representa el porcentaje de hueso formado en los defectos regenerados con los diferentes granulados compuestos a base de HA y el grupo CONTROL.

Tras los resultados mostrados, se ha determinado que el empleo de granulados de HA porosa contribuye a mejorar la formación de hueso en defectos de tamaño subcrítico frente a la regeneración sin empleo de biomaterial de injerto óseo. En cambio, el uso de material de HA totalmente denso no mejora la formación ósea, sino que decelera o impide el crecimiento de hueso nuevo, pues los resultados de la cantidad de hueso han sido inferiores que en el grupo en el que no se ha empleado sustituto óseo (CONTROL). El hallazgo remarcable de esta investigación reside en la gran cantidad de hueso nuevo formado en los

defectos regenerados con la HA POROSA sintetizada en la presente tesis doctoral. A pesar de no ser un incremento estadísticamente significativo, el hueso nuevo formado en el grupo HA POROSA fue superior al obtenido en el grupo HA COMERCIAL (Bio-Oss®), un material de referencia a nivel mundial en la regeneración ósea guiada. Aunque la HA sintética posee una mayor fragilidad que el hueso bovino (204,205), la tasa de reabsorción del material y de formación de hueso nuevo permitió el cierre completo del defecto sin permanencia apenas de granulado transcurridos 4 meses desde su implantación. Con el empleo de este sustituto óseo se evitaría la interferencia en el crecimiento de hueso a causa de la permanencia del injerto óseo, manteniendo sin embargo un volumen óseo adecuado y de calidad idónea; pues cómo se ha observado, el hueso formado alrededor de las partículas de hidroxiapatita porosa es un hueso lamelar de elevada densidad. Aun así, serían necesarios ensayos que determinasen las propiedades físicas de los defectos regenerados con HA POROSA.

Se desconoce cuál es la arquitectura que debe poseer una esponja para que tenga lugar sobre la misma el crecimiento de hueso de la forma más optimizada posible. Los resultados obtenidos determinan que, empleando materiales de composición química hidroxiapatita, no es necesaria una porosidad total muy elevada como, por ejemplo, por encima del 75%, ya que podría producir una disolución demasiado rápida de la estructura que no favoreciese la regeneración ósea. Una porosidad total en torno al 50% ha sido adecuada para obtener un cierre completo de defectos regenerados con biomateriales confeccionados a base de HA. Esto concuerda con los reportado por Hing et al. (2005) y AbdulQader et al. (2016), quienes establecieron una porosidad total ideal en torno al 50-60% (318,319). En lo que a la distribución de los poros respecta, a partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que una distribución bimodal favorece la formación de hueso en el caso de la HA. La HA POROSA sintetizada en este trabajo posee una cantidad elevada de microporos por debajo de 50 μm (70.7%). Los poros de menor tamaño tienen un diámetro de entre 1 y 0.01 μm y presentan el 17.1% del total de los poros. Los poros situados entre 50 y 1 μm , sin embargo, representan la mayor fracción, el 53.6% del total de los poros. Este elevado porcentaje de microporos ha permitido la correcta

formación de hueso, a pesar de que algunos autores como Rosa et al. (2003), hayan afirmado que una cantidad superior al 30% de microporos podría inducir una disgregación más rápida de lo deseable del granulado de HA y una liberación demasiado acusada de iones calcio y fosfato que interfieren en la viabilidad y proliferación de células óseas (321).

En lo que al área de superficie se refiere, según los resultados presentados, no es necesaria una elevada superficie específica ni un alto porcentaje de poros en el rango de nanómetros en un biomaterial de HA para inducir una formación de hueso más rápida en defectos subcríticos, en contraposición a lo afirmado por Davies et al. (2007) (34). Siendo estas propiedades de vital importancia en la formación de hueso ectópico, de acuerdo con Zhang et al (2014) y Barba et al. (2017) (326,327).

En última instancia, la macroporosidad presente en el granulado poroso de HA sintetizado en el presente trabajo representó el 29.3% del total de la porosidad presente en el mismo, y el rango del diámetro de los mismos se situó entre 150 y 50 μm . Se sabe que la presencia de macroporosidad es de vital importancia para que tenga lugar la angiogénesis y, en definitiva, la formación y crecimiento de hueso nuevo gracias a la propiedad osteoconductiva que permiten los mismos. Como ya se ha mencionado en la revisión bibliográfica de este trabajo, acerca del tamaño ideal de los macroporos hay discrepancias en la literatura. Se sabe que el trabeculado óseo humano presenta un diámetro que se encuentra entre 100 y 250 μm (395). En general, se menciona que el diámetro de la macroporosidad debe situarse entre 100 y 400 μm (304). A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, un diámetro de poros máximo de 150 μm es suficiente para que tenga lugar la formación de hueso a través de las partículas del biomaterial. Poros de tamaños mayores quizá fomenten una disgregación demasiado rápida del granulado que enlentezca la formación de hueso.

Para concluir, se puede afirmar que un granulado de composición química de HA que presenta una porosidad en torno al 50% y una distribución bimodal de la misma con un 30% macroporosidad entre

150 y 50 μm , y un 70% de microporos entre 50 y 0.1 μm , induce mejoras en la cantidad y calidad de hueso nuevo tras 16 semanas desde su implantación, comparado con otros materiales de la misma composición química pero diferente estructura (como es el granulado totalmente denso y el material comercial Bio-Oss®). Del mismo modo, dicho material contribuye a una formación de hueso más rápida que en las situaciones en las que no se ha empleado ningún material.

b. Material remanente

Para determinar la influencia de la porosidad y de la microestructura de superficie en la reabsorción de la hidroxiapatita se ha medido el porcentaje de material remanente en cada uno de los grupos obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3.19):

Tabla 3.19: Tabla en la que se muestran las características de los distintos materiales de HA empleados en el presente trabajo y los porcentajes de material remanente en los defectos regenerados con los mismos 4 meses después de su implantación

GRUPO	POROSIDAD	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m^2/g)	DIÁMETRO DE GRANO (mm)	% MATERIAL	SD
HA DENSA	0.6 ± 0.3	0.01	0.25-1	21.21	8.60
HA POROSA	46.7 ± 2.1	0.48 ± 0.02	0.25-1	9.46	6.06
HA COMERCIAL (BIO-OSS®)	55.6 ± 0.4	84.53 ± 4	0.25-1	20.33	6.78

La hipótesis nula formulada para realizar la prueba estadístico ANOVA de 1 factor se puede leer a continuación:

- H_{08} : No existen diferencias significativas en la cantidad de material remanente entre los grupos HA DENSA y HA POROSA y HA COMERCIAL.

El resultado tras la realización de dicho test paramétrico se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos, por lo que se rechazó la hipótesis nula H_{08} . Con el test a posteriori de Henry Scheffé se mostró que existió significación estadística en las diferencias

en la presencia de material entre los grupos HA DENSA y HA POROSA ($p=0$) y entre los grupos HA POROSA y HA COMERCIAL ($p=0.005$), siendo inferior en el grupo HA POROSA, debido a su acusada degradabilidad. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en la cantidad de material presente en los grupos HA DENSA y HA COMERCIAL ($p=0.992$), a pesar de su diferencia en la porosidad y área de superficie.

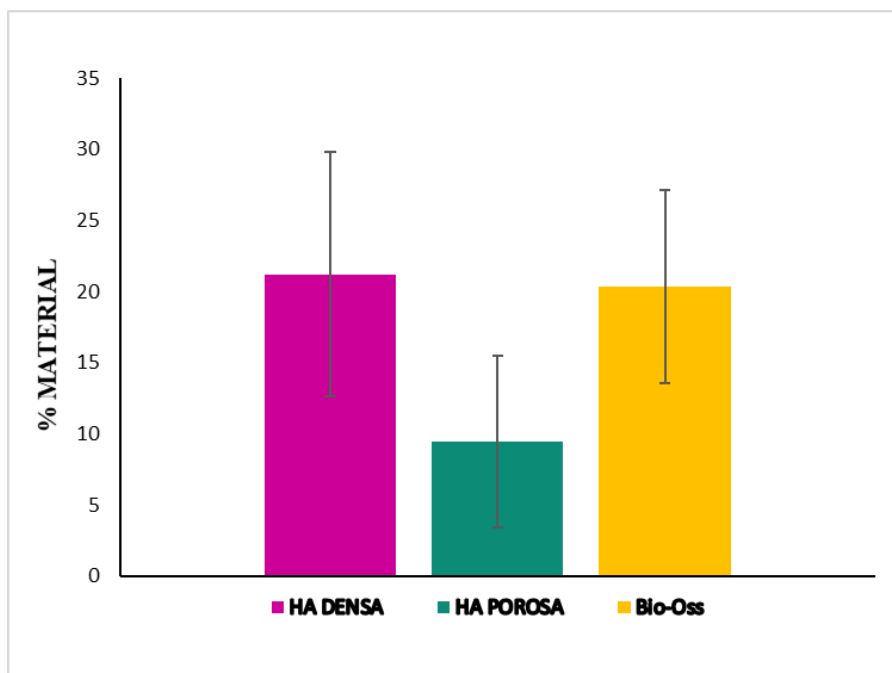


Fig. 3.66: Histograma en el que se representa el porcentaje de material remanente de los materiales de HA empleados como sustitutos óseos después de 16 semanas desde su implantación.

Se ha demostrado que la ausencia de poros impide la degradabilidad de la hidroxiapatita. En el grupo HA DENSA, a pesar de tratarse de HA sintética, la solubilidad del material ha sido menor que en los grupos en los que los materiales poseen porosidad, excepto para el xenoinjerto Bio-Oss®. Sin embargo, es un hecho reseñable, pero que coincide con la literatura, que el Bio-Oss® haya presentado una

solubilidad muy baja a pesar de su elevada porosidad, lo que ha resultado en la falta de significación estadística entre la solubilidad que presentó la HA DENSA y el Bio-Oss®. Aunque en la literatura se haya referenciado su escasa degradabilidad, este material posee una elevada porosidad del 55.6%, de la cual su mayor parte son microporos de entre 50-0.001 μm . Por lo tanto, posee poros en el rango nanométrico responsables de su elevada superficie específica (84.53 m^2/g). En este trabajo, el comportamiento de la HA POROSA sintética y el Bio-Oss® no pueden ser comparados a causa de su diferente naturaleza, pues uno es un xenoinjerto de hueso bovino y otro un sustituto óseo sintético. No obstante, la composición química de ambos es hidroxiapatita y el porcentaje de poros es comparable, siendo incluso superior el de Bio-Oss®, 55.6% frente al 46.7% de la HA POROSA. La presencia de macroporos entre 150 y 50 μm es superior en la HA POROSA que en el material comercial Bio-Oss®, el cual contiene un porcentaje mayor de microporos y de menor diámetro. Por tanto, se puede concluir que la macroporosidad ejerce un papel fundamental en la reabsorción de la HA, siendo en cambio, la microporosidad, un factor menos relevante en la misma.

3.2.3.2.2.2- β -fosfato tricálcico

a. Hueso formado

Se ha estudiado la cantidad de hueso formado con los diferentes materiales de β -fosfato tricálcico descritos. Las características comunes de estos materiales son su composición química (β -fosfato tricálcico $\geq 95\%$) y el diámetro de grano (entre 0.25 y 1 mm). Estos granulados se diferencian en la porosidad y área de superficie. Dichas características se muestran a continuación en la Tabla 3.20:

Tabla 3.20: Tabla en la que se muestran las características de los distintos materiales de β -TCP empleados en el presente trabajo y los porcentajes de hueso formado en los defectos regenerados con los mismos 4 meses después de su implantación.

GRUPO	POROSIDAD	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMETRO DE GRANO (mm)	% HUESO	SD
CONTROL	-	-	-	42.57	9.31
B-TCP DENSO	0.6 \pm 0.3	0.01	0.25-1	39.93	12.20
B-TCP POROSO	45.9 \pm 1.8	0.40 \pm 0.01	0.25-1	43.96	6.62
B-TCP COMERCIAL (KERAOS®)	21.2 \pm 1.9	0.28 \pm 0.03	0.25-1	56.42	13.09

La hipótesis nula establecida para evaluar las diferencias en la formación de hueso empleando los distintos materiales de β -TCP fueron:

- H_{09} : No existen diferencias significativas en la cantidad de hueso formado en los grupos CONTROL, β -TCP DENSO, β -TCP POROSO y β -TCP COMERCIAL.

El test de ANOVA de 1 factor mostró la presencia de diferencias significativas en el porcentaje de hueso formado en los defectos regenerados con β -TCP de diferentes estructuras de superficie y porosidades; por consiguiente, se descartó la hipótesis nula H_{09} anteriormente formulada. Con la prueba a posteriori de Scheffé se comprobó que se presentaron diferencias significativas en la cantidad de hueso formado entre el grupo CONTROL y el grupo β -TCP COMERCIAL, siendo significativamente inferior el hueso presente en el primer grupo ($p=0.039$). No obstante, no existieron diferencias significativas en la cantidad de hueso neoformado entre los grupos CONTROL y β -TCP DENSO ($p=0.805$), siendo ligeramente inferior la cantidad en el segundo grupo; y tampoco las hubo entre los grupos CONTROL y β -TCP POROSO ($p=0.988$), siendo levemente superior en el segundo grupo. En lo que respecta al porcentaje de hueso nuevo en según los diferentes materiales empleados, solamente presentó diferencias significativas la comparación entre los grupos β -TCP DENSO y β -TCP COMERCIAL, siendo significativamente inferior la

cantidad de hueso presente en el primer grupo ($p=0.007$). Las diferencias en la cantidad de hueso presente entre los grupos β -TCP DENSO y β -TCP POROSO ($p=0.764$), y entre los grupos β -TCP POROSO y β -TCP COMERCIAL ($p=0.065$) no mostraron significación estadística, siendo la cantidad de hueso presente inferior en los primeros grupos respectivamente.

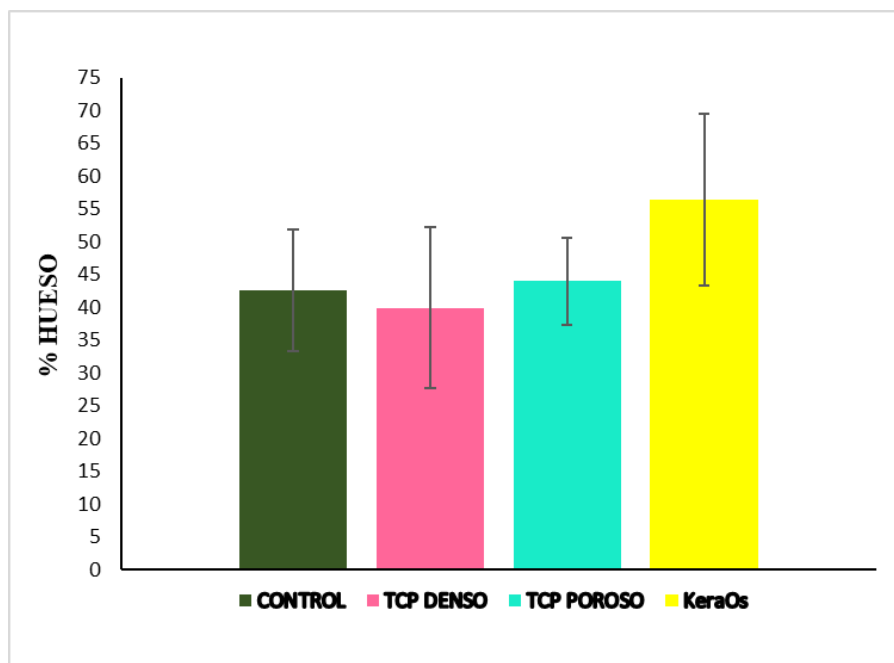


Fig. 3.67: Histograma en el que se representa el porcentaje de hueso formado en los defectos regenerados con los diferentes granulados compuestos a base de β -TCP y el grupo CONTROL.

Tras el estudio de la influencia sobre la neoformación ósea de las diferentes micro y macroestructuras de β -fosfato tricálcico, se ha observado que los granulados porosos favorecen la formación de hueso nuevo frente al empleo de materiales totalmente densos o en comparación con no emplear injerto de hueso. Sin embargo, es reseñable que no se observaron diferencias estadísticas en la cantidad de hueso formado con el β -TCP POROSO y el β -TCP DENSO

sintetizados en la presente tesis doctoral, y tampoco entre ambos con el grupo CONTROL. A pesar de estos resultados, cabe destacar que en los defectos regenerados con β -TCP POROSO se ha producido un cierre completo de los mismos, a diferencia de lo sucedido en los defectos que han sido regenerados con β -TCP DENSO y en los que no se ha implantado ningún biomaterial (grupo CONTROL).

El material de β -TCP COMERCIAL empleado (KeraOs®), ha tenido el mejor resultado en lo que cantidad de hueso nuevo se refiere (56.42%), similar al obtenido con la HA POROSA descrito anteriormente (58.62%). Las estructuras porosas empleadas se diferencian fundamentalmente en la distribución del tamaño de sus poros. Mientras que el β -TCP POROSO presenta una macroporosidad de entre 150 y 50 μm del 29.5%, el KeraOs® no contiene poros en ese rango de diámetro, sino que concentra su microporosidad entre 10 y 0.1 μm . Por otra parte, la porosidad total también ha sido diferente en ambos materiales, el material comercial KeraOs® presenta una porosidad total de 21.2%, mientras que el material poroso de β -TCP sintetizado en esta investigación fue del 46%. El área de superficie fue muy baja para ambos, 0.28 m^2/g para el KeraOs® y 0.40 m^2/g para el β -TCP POROSO.

Se han publicado diferentes trabajos acerca del tamaño ideal de los poros para granulados o esponjas compuestas por β -TCP. Von Doernberg et al. (2006) estableció un tamaño máximo de poros de 260 μm , pues con tamaños mayores las cerámicas sufrían una rápida reabsorción, lo que provocaba el enlentecimiento en la formación de hueso (310). En cambio, a raíz de su investigación, Itälä et al. (2001) ha afirmado que la formación de hueso tiene lugar sobre materiales con porosidad máxima de 50 μm , sin necesidad de alcanzar 100 μm (307). En este trabajo, se ha comprobado que para materiales de β -TCP, con un diámetro de poros máximo de 10 μm , se forma hueso mineralizado sobre los mismos y sin que tenga lugar una condrogénesis previa, hecho que había referido Karageorgiou et al. (2005) (308). Este resultado también contrasta con lo reportado por Feng et al. (2011), quién afirmó que el tamaño mínimo para que tenga lugar la neoformación ósea es de

50 μm (315). En la presente investigación, la presencia de macroporosidad de diámetro entre 150 y 50 μm , provocó una reabsorción del material demasiado rápida que, aunque dejando a su paso un hueso que ha cerrado los defectos, la cantidad del mismo ha sido inferior que la obtenida con el material que solamente contenía microporosidad (KeraOs®). A partir de este resultado no se puede deducir que la presencia de macroporosidad interconectada no sea necesaria cuando se emplea un sustituto óseo de composición química β -TCP. En la literatura figura que el papel de los macroporos es indispensable en la formación de hueso, pues permite la angiogénesis y, en definitiva, en el transporte de oxígeno y nutrientes para la formación del mismo. En este trabajo se han empleado granulados porosos con un tamaño de las partículas de entre 250 y 1000 μm . Cuando se colocan dichas partículas en el interior del defecto, deben ser compactadas de modo que entre las mismas permanezcan poros e interconexiones, que tienen la función de la macroporosidad mencionada en la literatura. Clínicamente, debe observarse la presencia de sangrado tras la compactación de las partículas de material. Esto indica que no se ha colocado demasiado material y que su compactación no ha sido excesiva.

b. Material remanente

Para determinar la influencia de la porosidad y de la microestructura de superficie en la disgregación del β -TCP en tejidos vivos, se ha medido el porcentaje de material remanente en los defectos regenerados con cada uno de los materiales descritos, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3.21):

Tabla 3.21: Tabla en la que figuran las características de los distintos materiales de β -TCP empleados en el presente trabajo y los porcentajes de material remanente en los defectos regenerados con los mismos 4 meses después de su implantación.

GRUPO	POROSIDAD	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMETRO DE GRANO (mm)	% MATERIAL	SD
β -TCP DENSO	0.6 \pm 0.3	0.01	0.25-1	10.26	2.36
β -TCP POROSO	45.9 \pm 1.8	0.40 \pm 0.01	0.25-1	2.15	1.56
β -TCP COMERCIAL (KERAOS®)	21.2 \pm 1.9	0.28 \pm 0.03	0.25-1	10.19	4.07

La hipótesis nula formulada para establecer las diferencias en la cantidad de material entre los distintos grupos mencionados fue la siguiente:

- H_{10} : No existen diferencias significativas en la cantidad de material remanente entre los grupos β -TCP DENSO, β -TCP POROSO y β -TCP COMERCIAL.

Según los resultados obtenidos, se rechazó la hipótesis nula H_{10} dado que existió significación estadística la diferencia en la cantidad de material presente en los distintos grupos estudiados ($p < 0.05$). El test post hoc mostró diferencias en la cantidad de material remanente entre el grupo β -TCP DENSO y el grupo β -TCP POROSO ($p=0$), y entre los grupos β -TCP COMERCIAL y β -TCP POROSO ($p=0$); siendo siempre menor en el segundo de los grupos. La cantidad de material remanente para los grupos β -TCP DENSO y β -TCP COMERCIAL no mostró diferencias significativas ($p=1$).

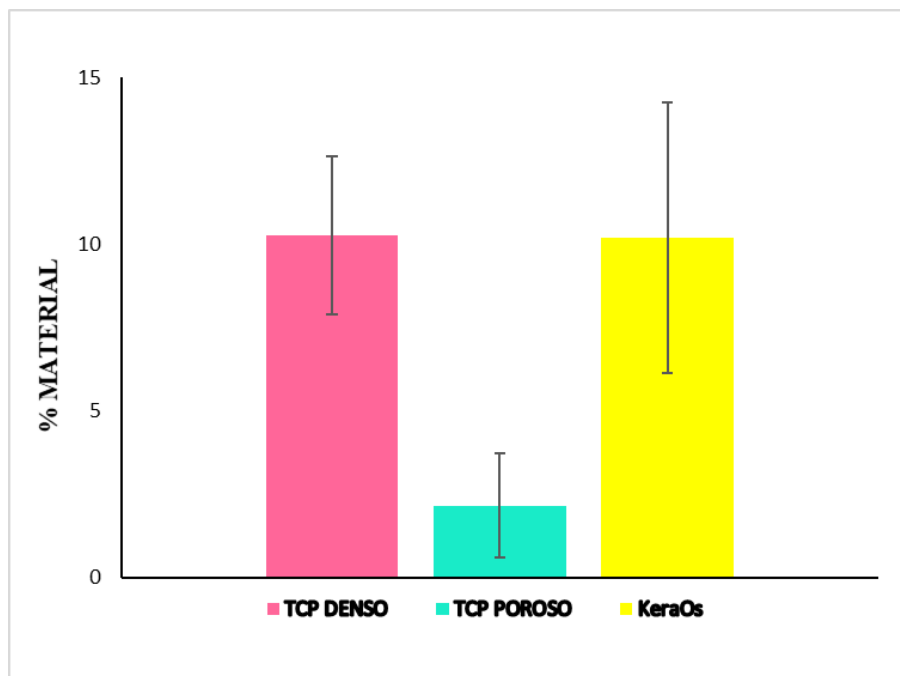


Fig. 3.68: Histograma en el que se representa el porcentaje de material remanente de los diferentes biomateriales de β -TCP empleados como sustitutos óseos transcurridas 16 semanas desde su implantación.

En lo que respecta a la reabsorción de los granulados de β -TCP, en función de los resultados presentados, se han realizado las siguientes observaciones. La disgregación de los granulados ha sido mayor a la observada para el material HA, con valores en torno al 90% para todos los granulados transcurridas 16 semanas desde la implantación de los mismos. Un hecho señalable es la observación de una disgregación similar para el material β -TCP DENS0 que para el material β -TCP COMERCIAL. En el primero, la porosidad y el área de superficie son despreciables; en cambio, el segundo, presenta microporosidad y área de superficie, aunque en valores bajos (2.21% de porosidad total y 0.28 m^2/g de superficie específica). Por otra parte, la reabsorción del material β -TCP POROSO ha alcanzado prácticamente la totalidad después de 4 meses, permaneciendo solamente un 2.15% del mismo. En este caso, la porosidad total en este material fue superior a los demás (en torno al

46%), aunque el área de superficie no mostró un valor muy superior al β -TCP COMERCIAL ($0.40 \text{ m}^2/\text{g}$ el primero frente a $0.28 \text{ m}^2/\text{g}$ el segundo). Una característica que diferencia estos materiales entre sí es la presencia de macroporosidad en el β -TCP POROSO. Se atribuyó una solubilidad demasiado elevada en cerámicas de β -TCP a la presencia de una microporosidad muy elevada (25-30%), lo que afectó a la viabilidad de los osteoclastos por el aumento de la concentración de iones calcio y fosfato en el entorno (322). Sin embargo, Lapczyny et al. (2014), no encontraron diferencias en la neoformación ósea modificando los porcentajes de microporosidad presente en materiales de β -TCP (323). Según lo expuesto en este trabajo, se ha observado que la presencia de macroporosidad ejerce un papel de mayor importancia en la reabsorción y solubilidad de granulados de composición química de β -TCP que la microporosidad. Lee et al. (2016), observaron una reabsorción inferior que la presentada en el β -TCP POROSO empleado en la presente investigación (del 69.5% frente al 97.85%), transcurridas 12 semanas desde la implantación de partículas de la misma composición química pero con una porosidad muy superior (del 75%), aunque constituida únicamente por nanoporos de entre 250 y 600 nm y con una superficie específica elevada para tratarse de un material sintético ($2.5 \text{ m}^2/\text{g}$) (279). Este resultado constata la importancia del papel de la macroporosidad en la reabsorción de los biomateriales con composición química de β -TCP.

A raíz de lo mencionado, se concluye que cuando se emplean partículas de β -TCP se necesita que el porcentaje correspondiente a la macroporosidad no sea demasiado elevado para que la disgregación del material no se produzca con demasiada rapidez, y así, poder optimizar la formación de hueso. En cuanto al área de superficie, se ha comprobado que la presencia de la misma no es indispensable para obtener valores elevados en la formación de hueso tras 16 semanas de la implantación del material empleando granulados de β -TCP que contengan una cierta microporosidad.

3.2.3.4- Análisis de correlación simple

Para estudiar si existe relación entre la reabsorción del material y la cantidad de hueso nuevo formado, se ha realizado la prueba paramétrica para obtener el Coeficiente de Correlación de Pearson y así poder establecer qué tipo de asociación existe entre estas dos variables.

El empleo de este test sirve para determinar el grado de relación lineal entre dos variables cuantitativas. Esta puede ser positiva o negativa, con valores que oscilan entre +1 y -1, siendo una relación perfecta positiva la primera y perfecta negativa la segunda. Es decir, una relación entre dos variables X e Y es perfecta positiva cuando en la medida que aumenta una de ellas, la otra también aumenta en la misma proporción; y una relación entre dos variables X e Y es perfecta negativa cuando en la medida que una variable aumenta, la otra disminuye en la misma proporción (404).

En este trabajo, como ya se ha mencionado, se ha pretendido estudiar si existe relación directa entre la reabsorción de los materiales y la formación de hueso como consecuencia de dicha disgregación. Es decir, determinar si se produce una tasa de reabsorción del material que favorece la neoformación ósea. Para ello, se ha evaluado la cantidad de material remanente con cada uno de los materiales empleados al respecto de la cantidad de hueso presente. De este modo se ha pretendido determinar si a menor cantidad del primero, hay una mayor cantidad del segundo.

3.2.3.4.1- Hidroxiapatita

Para realizar el coeficiente de correlación de Pearson entre el material hidroxiapatita y el hueso, la hipótesis nula planteada ha sido la siguiente:

- H₁₁: No existe una relación lineal entre la reabsorción de HA y la formación de hueso nuevo cuando es empleado como material de regeneración ósea.

Los resultados tras la realización del test han sido los siguientes:

El coeficiente de correlación lineal para las variables MATERIAL HA y HUESO ha sido de -0.63, con una significación estadística de $p=0.003$. Estos resultados se muestran gráficamente en la Fig. 3.69 que aparece a continuación:

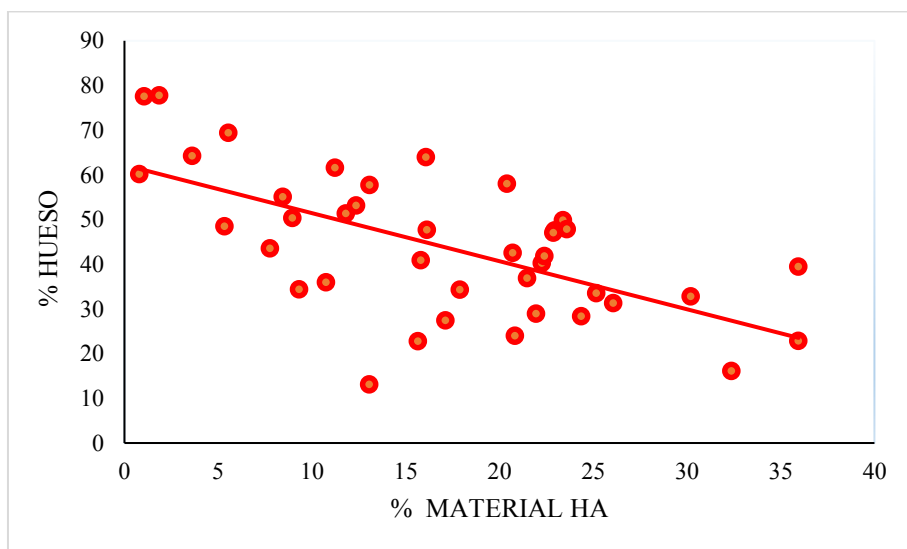


Fig. 3.69: Diagrama de dispersión que muestra la relación lineal inversa que existe entre la cantidad de material y la cantidad de hueso presente en las muestras regeneradas con el biomaterial HA. También se muestra la recta de regresión lineal, con ecuación $Y = -0.1755X + 62.194$.

A partir de la nube de puntos mostrada, se puede admitir que existe una relación lineal inversa entre las variables estudiadas, tal y como indica la significación estadística ya mencionada. Según los criterios de Guilford y Carrasco, se trata de una relación considerable y aceptable respectivamente (405). Por otra parte, el coeficiente de determinación

ha sido (R^2) = 0.39. Este resultado indica que un cambio en la variable MATERIAL explica un 39% de cambio en la variable HUESO.

Según los resultados expuestos, se descarta la hipótesis nula H_{11} , pues existe una relación lineal entre la disminución de la cantidad de material hidroxapatita y el aumento de la cantidad de hueso.

En la presente tesis doctoral, la velocidad de reabsorción de los granulados de HA empleados ha sido la adecuada para permitir la reabsorción ósea. Es decir, a medida que disminuyó la cantidad de material de HA se produjo un aumento en la presencia de hueso. Por tanto, se puede concluir que la tasa de reabsorción de material de HA y formación de hueso nuevo ha sido adecuada.

3.2.3.4.2- β -fosfato tricálcico

Para obtener el coeficiente de correlación de Pearson entre el material β -TCP y el hueso, la hipótesis nula planteada ha sido la siguiente:

- H_{12} : No existe una relación lineal entre la reabsorción de β -TCP y la formación de hueso nuevo cuando es empleado como material de regeneración ósea.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

El coeficiente de correlación lineal para las variables MATERIAL β -TCP y HUESO ha sido de -0.078, resultado que no ha presentado significación estadística ($p=0.996$). Estos resultados se representan a continuación en la Fig. 3.70:

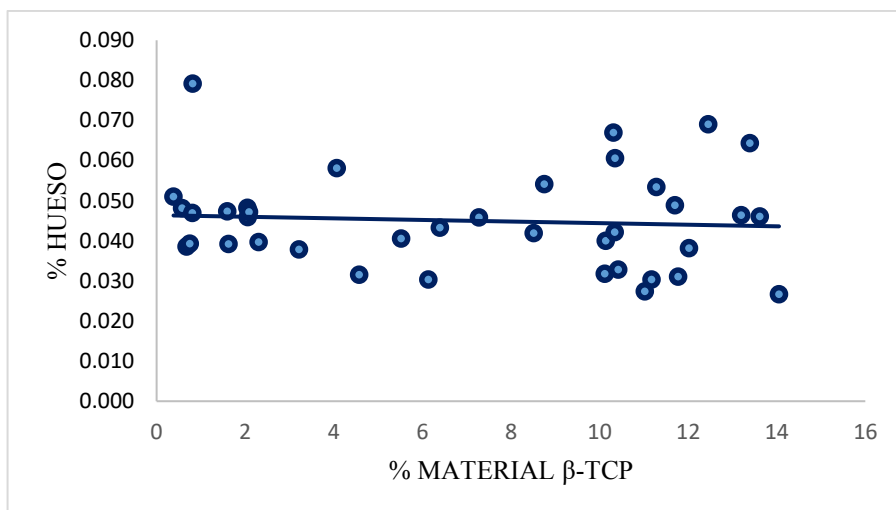


Fig. 3.70: Diagrama de dispersión que muestra la ausencia de relación lineal inversa que existe entre la cantidad de material de β -TCP y la cantidad de hueso presente. También es representada la recta de regresión lineal, con ecuación $Y = -0.1985X + 46.392$.

A partir de la nube de puntos representada, se admite que no existe una relación lineal entre las variables estudiadas, tal y como indica la ausencia de significación estadística obtenida en el test. Asimismo, el coeficiente de determinación ha sido $(R^2) = 0.0061$, lo que indica que un cambio en la variable MATERIAL explicaría solamente un 0.61% del cambio en la variable HUESO.

A raíz de estos resultados se aceptó la hipótesis nula H_{12} , pues no se presentó una relación lineal entre la disminución de la cantidad de material de β -TCP y el aumento en la cantidad de hueso subyacente.

Según lo expuesto, se puede concluir que con los granulados de β -TCP que se han empleado en el presente trabajo de investigación, la tasa de reabsorción del material no ha ido en concordancia con la velocidad de neoformación ósea. Este resultado es derivado de una velocidad de disgregación demasiado rápida en alguno de los granulados empleados, como ha sido el caso del granulado de β -TCP POROSO.



RESUMEN Y CONCLUSIONES



4- RESUMEN Y CONCLUSIONES

4.1- RESUMEN

Tras el desarrollo del trabajo expuesto en los Capítulos anteriores de esta memoria, y a la vista de los objetivos planteados y de los resultados obtenidos, se resume lo siguiente.

Para la regeneración durante 16 semanas de defectos óseos subcríticos (7 mm de diámetro y 2 mm de espesor) generados en calotas craneales de conejos New Zealand, se han empleado granulados de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico con diferentes características en su estructura. Estas diferencias se han establecido en la macroestructura, es decir, en la macroporosidad por encima de 50 μ m, y en la microestructura, correspondiente a los microporos por debajo de 50 μ m y en su área de superficie. En ambos casos (hidroxiapatita y fosfato tricálcico), los materiales se han utilizado en forma de granulados con partículas redondeadas entre 250 y 1000 micras, con porcentajes de porosidad y tamaño de poro idénticos.

Con fines de comparación se han estudiado biomateriales ampliamente utilizados en el campo de la cirugía oral regenerativa. Por un lado, el xenoinjerto Bio-Oss®, que consiste en hueso bovino desproteinizado, compuesto fundamentalmente por hidroxiapatita y es el estándar de oro de la regeneración oral; y por otro, el sustituto óseo KeraOs®, formado por β -fosfato tricálcico puro.

En el trabajo se ha demostrado que es posible obtener granulados con una densidad aparente muy próxima a la densidad real de ambos materiales (en torno al 97%), sin necesidad de que sean sometidos a temperaturas de sinterización muy elevadas, lo que podría provocar la aparición de fases secundarias no deseadas que conlleven al empeoramiento de sus propiedades físicas. Esto se ha logrado mediante el pretratamiento térmico a 800 °C de los polvos sintetizados de ambas composiciones químicas. Esta calcinación facilita la

manipulación del material e inhibe el crecimiento de grano durante el posterior sinterizado para así optimizar su densificación. A continuación, las piezas de las que se obtuvieron los granulados densos se han prensado isostáticamente a 200 MPa y se han sinterizado a las temperaturas correspondientes para cada material (1200 °C para la hidroxiapatita y 1125 °C para el β -fosfato tricálcico). Finalmente, se ha procedido a la molienda de dichas piezas para obtener el granulado denso con partículas de tamaño entre 250 μm y 1 mm, y al redondeo de su superficie.

En la síntesis de los granulados de porosidad media se ha realizado un pretratamiento térmico de los materiales a 1000 °C, para su posterior procesamiento mediante el método de replicación de esponjas impregnando algodones en barbotinas con el 70% en peso de polvo de HA o de β -TCP y el 30% restante de agua destilada. A continuación, se han sometido dichos algodones impregnados en cada una de las barbotinas a la temperatura que le corresponde a cada material para su sinterización y calcinación del componente orgánico, en este caso el algodón (1200 °C para la hidroxiapatita y 1125 °C para el β -fosfato tricálcico). Del mismo modo que con el granulado denso, se ha procedido a una molienda para obtener el granulado poroso con partículas de diámetro entre 250 μm y 1 mm. Con el procedimiento citado, se ha logrado obtener partículas de HA y TCP similares, y con idéntica porosidad y tamaño de poro, tal como se indica en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Características de los granulados que se han empleado en esta tesis doctoral como sustitutos óseos.

GRANULADO	COMPOSICIÓN QUÍMICA	POROSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE POROS (%)	SUPERFICIE ESPECÍFICA (m ² /g)	DIÁMETRO DE GRANO (mm)
HA COMERCIAL (BIO-OSS®)	≥99% hidroxiapatita	55.6 ± 0.4 (150-50 μm: 16.3% 50-0.005μm: 83.7%)	84.53 ± 4	0.25-1
β-TCP COMERCIAL (KERAOS®)	≥ 99% β-fosfato tricálcico	21.2 ± 1.9 (10-0.1: 100%)	0.28 ± 0.03	0.25-1
HA DENSA	≥99% hidroxiapatita	0.6 ± 0.3	0.01	0.25-1
β-TCP DENSO	≥99% β-fosfato tricálcico	0.6 ± 0.3	0.01	0.25-1
HA POROSA	≥99% hidroxiapatita	46.7 ± 2.1 (150-50 μm: 29.3% 50-0.001 μm: 70.7%)	0.48 ± 0.02	0.25-1
β-TCP POROSO	≥ 99% β-fosfato tricálcico	45.9 ± 1.8 (150-50 μm: 29.5% 50-0.001 μm: 70.5%)	0.40 ± 0.01	0.25-1

Transcurridas 16 semanas de la implantación de los distintos materiales en defectos en la calota craneal de conejos New Zealand de tamaño subcrítico, y extraída la zona de muestra, se procedió a la confección de láminas delgadas de secciones sagitales y horizontales de dichos defectos. A continuación, se desarrolló el estudio histomorfométrico, a través del cual se evaluó el crecimiento de hueso y el material remanente con cada material empleado.

Como ya se ha mencionado en anteriores capítulos, no se han observado reacciones de encapsulación, fibrosis, infección o inflamación alrededor de ninguno de los materiales implantados, existiendo en todos los casos una aposición directa del hueso sobre los gránulos de material, en mayor o menor porcentaje. En lo que respecta al crecimiento óseo, se han encontrado valores superiores de hueso

para los defectos en los que se han empleado granulados que presentan porosidad en su estructura en relación con aquellos defectos en los que no se ha implantado ningún material, o bien, el material implantado fue totalmente denso.

Los mejores valores de porcentaje de hueso neoformado correspondieron, en primera instancia, al granulado poroso de hidroxiapatita fabricado en este trabajo (58.62%), cuyas características son un porcentaje total de poros del 46.7%, de los cuales un tercio representa a la macroporosidad por encima de 50 μm y por debajo de 150 μm ; y los dos tercios restantes son microporos de tamaño entre 50 y 0.001 μm . Su superficie específica fue de 0.48 m^2/g . En segundo lugar, en cuanto a hueso neoformado, se sitúa el granulado comercial KeraOs® (56.42%), de composición química β -fosfato tricálcico, y que presenta un 21% de porosidad total con diámetro comprendido entre 10 y 0.1 μm , es decir, sus poros son únicamente microporos. Su superficie específica también presentó un valor bajo, de 0.28 m^2/g .

A continuación, le siguieron los porcentajes de hueso nuevo formado en los defectos en los que se había implantado Bio-Oss® (46.93%) y el β -TCP POROSO fabricado en esta tesis (43.96%), cuyas características han sido especificadas en la tabla 4.1 presentada anteriormente.

Puede observarse que, mientras la hidroxiapatita se ve favorecida por la presencia de macroporos en su estructura, la cual interviene directamente en la disolución del material acelerándola, hecho que permite dejar en su lugar hueso nuevo evitando los problemas derivados de la habitual insolubilidad y escasa bioactividad de los sustitutos de composición HA; en el β -TCP, la presencia únicamente de microporos favorece la formación de mayor cantidad de hueso ya que así se evita una disgregación del material demasiado rápida, característica de los materiales de dicha composición química. De este modo, el granulado permanece en el defecto el tiempo adecuado ejerciendo de andamio que vehiculiza la formación de hueso. Por otra parte, no es necesaria una superficie específica demasiado elevada

para que tenga lugar la formación de hueso sobre un sustituto óseo, pues con los materiales sintéticos mencionados, a pesar de obtener valores reducidos de área de superficie, la cantidad de hueso presente ha sido superior que en los defectos en los que se ha empleado un material con elevada superficie específica, como es el caso del Bio-Oss®.

Por tanto, se determina que la presencia de microporos de diámetro comprendido entre 0.1 y 50 μm es necesaria para la formación de hueso nuevo independientemente de la composición química del granulado. La macroporosidad, en cambio, es necesaria en aquellos materiales que presenten una baja solubilidad, como es el caso de la hidroxiapatita; pero su presencia está desaconsejada en aquellos materiales que presenten una tasa de reabsorción muy elevada, como ocurre con el β -fosfato tricálcico. Dicho de otro modo, las estructuras de hidroxiapatita deben poseer una distribución de poros bimodal, con microporos y macroporos, mientras que la porosidad del esqueleto de β -TCP debe ser monomodal y basada únicamente en microporos. En lo que respecta a la porosidad total, ningún material necesita porcentajes demasiado elevados. En el caso de la hidroxiapatita un porcentaje en torno al 50% del volumen total es suficiente (siempre y cuando la estructura esté compuesta por microporos y macroporos); y en la situación del β -TCP, es conveniente una porosidad total en torno al 25% (compuesta únicamente por microporos).

Los defectos que le siguen a los regenerados con materiales porosos en lo que a cantidad de hueso se refiere, han sido aquellos en los que no se ha empleado ningún material, es decir, los pertenecientes al grupo denominado CONTROL (42.57%). Finalmente, los defectos en los que se ha formado la menor cantidad de hueso han sido aquellos en los que se ha injertado el MATERIAL DENSO (31.32% para HA y 39.93% para β -TCP). Este resultado es derivado de varios factores. En primer lugar, los defectos del grupo CONTROL han tenido resultados favorables de hueso debido a que se trata de defectos subcríticos, con un diámetro de 7 mm, los cuales regenerarían por sí

solos. Además, su espesor es muy reducido, el correspondiente a las tablas externa e interna de la calota craneal, de aproximadamente 2 mm. Por último, se ha colocado una membrana colágena reabsorbible que tiene propiedades osteogénicas, lo que produce una aceleración en la formación de hueso en la parte exocraneal de los defectos. A partir de estos resultados, se ha determinado que el GRUPO CONTROL seleccionado para esta investigación probablemente no haya sido el más adecuado. Dado que los objetivos de esta investigación giraron en torno a la influencia de la micro y macroarquitectura de superficie de los materiales, así como de la composición química de los mismos, sería más apropiado poner como control un material bioinerte que, a pesar de no producir reacciones de inflamación o rechazo por parte del tejido huésped, no sufriese disgregación una vez implantado en el tejido óseo. De este modo se estudiaría el crecimiento óseo para el mismo volumen disponible.

En segundo lugar, en el caso de los defectos regenerados con los materiales densos, tanto hidroxiapatita como β -TCP, el material ha permanecido en los defectos como un “obstáculo físico” que, en lugar de vehiculizar el crecimiento óseo como en el caso de los materiales porosos, ha retrasado el crecimiento del mismo, pues este tuvo que aposicionarse sobre los gránulos que apenas habían sufrido disgregación para, a continuación, unirse entre sí. La mayor solubilidad del β -TCP favoreció un mejor resultado que para la HA en la formación de hueso, pues su disgregación fomenta la presencia de iones calcio y fosfato en el medio y aumenta su rugosidad de superficie, lo que promueve una mayor actividad osteoblástica y una adhesión de proteínas a la superficie de los gránulos, traduciéndose en una mejora en la neoformación ósea. Pero es importante destacar que en el GRUPO CONTROL, el espacio medular fue mucho mayor que en los GRUPOS DENSOS, es decir, la cantidad de “espacio ocupado” ha sido mayor en los defectos en los que se ha empleado material, debido a la suma de material y hueso. Por lo tanto, se ha observado que otro factor que intervino en la neoformación ósea fue la disponibilidad de espacio que permita su ocupación por este hueso nuevo. Este “espacio disponible” fue menor en los defectos

regenerados con material, especialmente en aquellos defectos en los que el material es totalmente denso y apenas ha sufrido disgregación.

Por otro lado, en lo que a la cantidad de material remanente se refiere, todas las formas de material HA han sufrido una disgregación menor que sus homólogas de β -TCP. Se ha comprobado que la composición es un factor determinante en la solubilidad de los biomateriales. Pues se han observado disoluciones similares para los materiales de HA POROSA (9.46% de material remanente) y de β -TCP DENSO (10.26% de material remanente), a pesar de que el primero presenta poros de diferente tamaño en el 50% de su volumen total y segundo no presenta porosidad en su estructura que contribuya a su disgregación.

La segunda causa que interviene en la reabsorción de un material por detrás de la composición química está relacionada con el tamaño de los poros. Se ha observado que los materiales que presentaban macroporos de tamaño mayor a 50 μm en su superficie sufrieron una disgregación muy elevada en comparación con las formas de igual composición química que no contenían macroporosidad; y en cambio, las estructuras formadas fundamentalmente por microporos presentaron una tasa de reabsorción similar a los materiales totalmente densos. Como ejemplo de ello, están el porcentaje de material remanente de HA DENSA (21.20%) y de HA COMERCIAL (Bio-Oss®) (20.33%) presente en los defectos regenerados con estos materiales. El primer material no contenía prácticamente porosidad (0.6%) y el segundo, a pesar de poseer una porosidad total considerable (55.6%), estaba constituida en un 84% por microporos, de los cuales la mayor parte se encontraba entre 0.1 y 0.01 μm . Sin embargo, el porcentaje de material presente tras 4 meses de HA POROSA que contenía macro y microporosidad fue del 9.46%. Del mismo modo, con granulados de composición química β -TCP, se ha encontrado similitud en el porcentaje de material remanente en los granulados DENSO (10.26%) y COMERCIAL (KeraOs®) (10.29%). El primero no presentó porosidad en su estructura (0.6%) y el segundo contenía una porosidad total de 21% compuesta únicamente por

microporos entre 10 y 0.1 μm . No obstante, el granulado de β -TCP POROSO conformado en un 30% por poros de tamaño superior a 50 μm sufrió una disgregación casi completa (2.15% de material presente en los defectos tras 16 semanas).

Por último, se ha evaluado la relación entre la reabsorción del biomaterial y la formación de hueso. Se sabe que lo ideal es que la misma sea inversamente proporcional; es decir, que la velocidad de disolución del material se produzca de forma sincronizada con la velocidad del crecimiento de hueso nuevo. En este trabajo, la correlación lineal inversa ha tenido significación estadística para los granulados de HA empleados; en cambio con los granulados de β -TCP empleados no se ha observado dicha significación. No se puede atribuir este hecho únicamente a la composición química de los granulados, ni se puede afirmar que un material sea más adecuado para la regeneración ósea que otro. Tampoco la arquitectura de superficie y/o la porosidad del material son factores decisivos para el crecimiento de hueso por sí solos.

Para que un material induzca una neoformación ósea de forma precoz no existe una composición química ideal, ni tampoco una arquitectura de superficie idónea, sino que se trata de una combinación de ambas características. Son imprescindibles formas porosas para acelerar la formación de hueso nuevo en defectos óseos. Sin embargo, no es tan importante una morfología, un porcentaje o distribución de los poros determinados. Lo que sí es relevante, es confeccionar el andamio poroso acorde con la composición química empleada. Las formas a base de HA se favorecen de la presencia de una porosidad total en torno a la mitad del volumen de su estructura y de la presencia en la misma de macroporos. En cambio, las estructuras de β -TCP deben contener una porosidad total menor (en torno a una cuarta parte del volumen total) y es recomendable que ésta esté compuesta fundamentalmente por microporos para decelerar su rápida reabsorción y que así la estructura pueda ejercer de soporte para el hueso nuevo.

En resumen, a lo largo de este trabajo:

- Se han determinado las propiedades y características de los biomateriales de regeneración ósea presentes en el mercado, Bio-Oss® y KeraOs®. Estas han sido: la superficie específica, el porcentaje de porosidad y la distribución de la misma, la composición química y el tamaño del granulado.
- Se han sintetizado polvos de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico de elevada pureza ($\geq 99\%$) a partir de métodos desarrollados en el Instituto de Cerámica de Galicia.
- Se han conformado implantes densos de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico a partir de la calcinación de los polvos obtenidos en las síntesis a 800 °C, su prensado isostático a 3000 kg/cm² y su sinterización a la temperatura adecuada para cada material (1200 °C y 1125 °C respectivamente).
- Se han conformado implantes micro y macroporosos de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico con una interconectividad controlada e igualada entre los mismos, siguiendo el método de replicación de esponjas impregnando algodón en barbotinas confeccionadas a partir de los polvos obtenidos en las síntesis y calcinados a 1000 °C, y su posterior sinterización a la temperatura adecuada para cada material (1200 °C y 1125 °C respectivamente).
- Se han preparado implantes densos y de porosidad controlada de hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico con el tamaño del granulado entre 0.25 y 1 mm, y se han esterilizado sometiendo a radiación gamma para la implantación de los mismos en pequeños animales.
- Se han implantado los injertos biocerámicos anteriormente descritos en defectos subcríticos de 7 mm de diámetro, confeccionados con una trefina en calotas craneales de conejos New Zealand.
- Se han preparado láminas delgadas de los defectos transcurridas 16 semanas desde la cirugía, a través del procedimiento específico para tejidos duros.
- Se han evaluado las zonas injertadas mediante los métodos radiológico e histomorfométrico para determinar el porcentaje de hueso nuevo formado y de material remanente después de 16 semanas.

4.2- CONCLUSIONES

Sobre el procesamiento y obtención de las biocerámicas implantadas.

1.- Es posible procesar materiales de HA y de TCP con densidades superiores al 97% de la densidad teórica, utilizando polvos finos del fosfato sintetizado precalcinados a 800°C, prensados isostáticamente a 5 T/cm², y sinterizados a alta temperatura (1100°-1200°C).

2.- Se pueden fabricar materiales de fosfato cálcico (HA y TCP) con porcentaje de porosidad, y distribución de tamaño de poros a demanda, utilizando una variante del método de la replicación de esponjas, con fibras de algodón como “template”. Las fibras se sumergen en una barbotina concentrada de polvo fino de fosfato cálcico precalcinado que las impregna. Una vez seco, el material resultante se trata en atmósfera oxidante a 400°-600°C para pirolizar la celulosa, y se consolida a temperaturas del orden de 1100°-1200°C según los casos.

3.- Se ha comprobado que el uso de molinos de bolas de baja energía, sin carga atritor, es útil para conseguir granulados redondeados partiendo de trozos de cerámicas de fosfato cálcico obtenidos por machaqueo y posterior clasificación granulométrica.

4.- Los productos finales elegidos para los estudios de bioactividad fueron a) granulados de HA y TCP densos y redondeados, con tamaños entre 250 y 1000 micras, y densidades superiores al 97% de la teórica; y b) granulados porosos de HA y TCP redondeados, con tamaños entre 250 y 1000 micras, con porosidades del 46%, tamaño medio de macroporo de 100 micras, y tamaño medio de microporo 0,5 micras.

Sobre la capacidad de regeneración ósea de las biocerámicas implantadas.

5.- Los materiales más efectivos en la producción de hueso neoformado a 4 meses de implantación son, por este orden:

- Granulado poroso de HA (58,62%).
- KeraOss® (56,42%).
- BioOss® (46,93%).
- Granulado β -TCP poroso (43,96%).
- Granulado de β -TCP denso (39,43%).
- Granulado de HA denso (31,32%).

6.- Las diferencias entre la regeneración ósea inducida por granulados de HA densos y porosos es de un 27,3%, mucho mayor que la diferencia de actividad entre granulados de β -TCP densos y porosos (4,6%). La porosidad del material es más decisiva por tanto en el fosfato más insoluble, el HA.

7.- Las diferencias en la inducción de hueso neoformado entre los dos fosfatos cálcicos densos es de un 8,1% a favor del β -TCP. Por el contrario, entre la actividad formadora de hueso de los granulados porosos la diferencia es de un 14,6% a favor del HA.

Como resumen de conclusiones y de acuerdo con el objetivo general formulado en la presente tesis doctoral, puede concluirse que, *tanto la composición como la microestructura y la topografía superficial a nivel de micro y meso escala (1-100 micras) de los implantes biocerámicos de fosfatos cálcicos determinan de forma conjunta su bioactividad, sin que pueda considerarse la influencia de cada uno de los factores de forma aislada.*

Por tanto, en la fabricación de sustitutos óseos de biocerámicas de fosfato cálcico para regeneración ósea es necesario tener en cuenta la composición del material, para adecuar las características de macro y micro estructura y de superficie específica a la misma, y

de este modo, obtener implantes biocerámicos con las propiedades adecuadas para la optimización de la neoformación ósea.



BIBLIOGRAFÍA





5- BIBLIOGRAFÍA

1. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop. abril de 1986;(205):299-308.
2. Martinez A, Balboa O, Gasamans I, Otero-Cepeda XL, Guitian F. Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. Clin Oral Implants Res. junio de 2015;26(6):623-32.
3. Santos Expósito C. Biomateriales cerámicos I: obtención y propiedades de biocerámicas de fosfato cálcico. [Santiago de Compostela]: Servicio de Publicacións e Intercambio Científico da Universidade de Santiago de Compostela; 1995.
4. Franco J, Souto A, Rey P, Guitián F, Martínez Ínsua A. Procesamiento cerámico de β -TCP para la fabricación de piezas implantables. Bol Soc Esp Cerámica Vidr. 30 de agosto de 2006;45(4):265-70.
5. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2015.
6. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. Instr Course Lect. 1987;36:27-48.
7. Singh, Incerbir. The architecture of cancellous bone. 127. 1978;2:305-10.
8. Carretero, Marián. Novedades en el tratamiento de la osteoporosis. Offarm. 2011;30(6):168-72.

9. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. Instr Course Lect. 1996;45:371-86.
10. Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. Trends Mol Med. julio de 2002;8(7):340-5.
11. Candelieri G., Liu F, Aubin J. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. Bone. abril de 2001;28(4):351-61.
12. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. Mol Cell Endocrinol. enero de 2000;159(1-2):7-13.
13. H. Robert Dudley, M.D., David Spiro M.D. The fine structure of bone cells. The Journal of Cell Biology. diciembre de 1961;627-49.
14. Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. Arch Biochem Biophys. mayo de 2008;473(2):201-9.
15. Buser D. 20 años de regeneración ósea guiada en Implantología Oral. Barcelona: Quintessence; 2012.
16. Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar Bone: Structure–Function Relations. J Struct Biol. junio de 1999;126(3):241-55.
17. Kim J-N, Lee J-Y, Shin K-J, Gil Y-C, Koh K-S, Song W-C. Haversian system of compact bone and comparison between endosteal and periosteal sides using three-dimensional reconstruction in rat. Anat Cell Biol. 2015;48(4):258.
18. Ng KW, Romas E, Donnan L, Findlay DM. Bone biology. Baillières Clin Endocrinol Metab. abril de 1997;11(1):1-22.

19. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* diciembre de 2009;1790(12):1592-8.
20. Young RW. CELL PROLIFERATION AND SPECIALIZATION DURING ENDOCHONDRAL OSTEOGENESIS IN YOUNG RATS. *J Cell Biol.* 1 de septiembre de 1962;14(3):357-70.
21. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: Insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec.* 1 de abril de 2001;262(4):398-419.
22. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem.* julio de 1994;55(3):273-86.
23. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The Efficacy of Bone Replacement Grafts in the Treatment of Periodontal Osseous Defects. A Systematic Review. *Ann Periodontol.* diciembre de 2003;8(1):227-65.
24. Duda GN, Haas NP, Bergmann G. Founding of the Julius Wolff Institut Charité – Universitätsmedizin Berlin: Editorial Comment. *Clin Orthop Relat Res.* abril de 2010;468(4):1050-1.
25. Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas.* mayo de 2008;60(1):65-9.
26. Menaa C, Kurihara N, Roodman GD. CFU-GM-Derived Cells Form Osteoclasts at a Very High Efficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* enero de 2000;267(3):943-6.
27. Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone.* agosto de 1995;17(2):S63-7.

28. Gowen M, Mundy GR. Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. J Immunol Baltim Md 1950. 1 de abril de 1986;136(7):2478-82.
29. Stein NC, Kreutzmann C, Zimmermann S-P, Niebergall U, Hellmeyer L, Goettsch C, et al. Interleukin-4 and Interleukin-13 Stimulate the Osteoclast Inhibitor Osteoprotegerin by Human Endothelial Cells Through the STAT6 Pathway. J Bone Miner Res. 4 de febrero de 2008;23(5):750-8.
30. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. Calcif Tissue Int. 1981;33(4):349-51.
31. Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte: Dallas & Bonewald. Ann N Y Acad Sci. abril de 2010;1192(1):437-43.
32. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 18 de abril de 1997;89(2):309-19.
33. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 1 de mayo de 1998;12(9):1260-8.
34. Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. Biomaterials. diciembre de 2007;28(34):5058-67.
35. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. J Cell Sci. abril de 2000;113 (Pt 7):1161-6.

36. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming Growth Factor- β Gene Family Members and Bone*. *Endocr Rev.* febrero de 1994;15(1):27-39.
37. Katagiri T, Osawa K, Tsukamoto S, Fujimoto M, Miyamoto A, Mizuta T. Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone formation: What have we learned from the history of a half century? *Jpn Dent Sci Rev.* mayo de 2015;51(2):42-50.
38. Kawai M, Rosen CJ. The Insulin-Like Growth Factor System in Bone. *Endocrinol Metab Clin North Am.* junio de 2012;41(2):323-33.
39. Adams JC, Watt FM. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Dev Camb Engl.* abril de 1993;117(4):1183-98.
40. Rozentryt P, Niedziela JT, Hudzik B, Doehner W, Jankowska EA, Nowak J, et al. Abnormal serum calcium levels are associated with clinical response to maximization of heart failure therapy. *Pol Arch Med Wewn.* 2015;125(1-2):54-64.
41. Wysolmerski JJ. Parathyroid Hormone-Related Protein: An Update. *J Clin Endocrinol Metab.* septiembre de 2012;97(9):2947-56.
42. Segawa H, Shiozaki Y, Kaneko I, Miyamoto K. The Role of Sodium-Dependent Phosphate Transporter in Phosphate Homeostasis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2015;61(Supplement):S119-21.
43. Currey JD. The design of mineralised hard tissues for their mechanical functions. *J Exp Biol.* diciembre de 1999;202(Pt 23):3285-94.
44. Stone KL, Seeley DG, Lui L-Y, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, et al. BMD at Multiple Sites and Risk of Fracture of Multiple

- Types: Long-Term Results From the Study of Osteoporotic Fractures. J Bone Miner Res. 1 de noviembre de 2003;18(11):1947-54.
45. Augat P, Schorlemmer S. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. Age Ageing. 1 de septiembre de 2006;35(suppl_2):ii27-31.
 46. Cole JH, van der Meulen MCH. Whole Bone Mechanics and Bone Quality. Clin Orthop Relat Res. agosto de 2011;469(8):2139-49.
 47. Yeni YN, Brown CU, Wang Z, Norman TL. The influence of bone morphology on fracture toughness of the human femur and tibia. Bone. noviembre de 1997;21(5):453-9.
 48. Nyman JS, Roy A, Shen X, Acuna RL, Tyler JH, Wang X. The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. J Biomech. enero de 2006;39(5):931-8.
 49. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. Osteoporos Int. marzo de 2006;17(3):319-36.
 50. F. G. Evans. Factors affecting mechanical properties of bone. 1973;49(9):751-64.
 51. Chalmers J, Conacher WD, Gardner DL, Scott PJ. Osteomalacia--a common disease in elderly women. J Bone Joint Surg Br. agosto de 1967;49(3):403-23.
 52. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. The Lancet. junio de 2002;359(9321):1929-36.
 53. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. The Lancet. abril de 2004;363(9418):1377-85.

54. Boling EP. Secondary osteoporosis: Underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Ther.* enero de 2004;26(1):1-14.
55. Veronese N, Bolzetta F, De Rui M, Maggi S, Noale M, Zambon S, et al. Serum uric acid and incident osteoporotic fractures in old people: The PRO.V.A study. *Bone.* octubre de 2015;79:183-9.
56. Chen C-Y, Lane H-Y, Lin C-H. Effects of Antipsychotics on Bone Mineral Density in Patients with Schizophrenia: Gender Differences. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 31 de agosto de 2016;14(3):238-49.
57. Xing RL, Zhao LR, Wang PM. Bisphosphonates therapy for osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *SpringerPlus* [Internet]. diciembre de 2016 [citado 13 de febrero de 2018];5(1). Disponible en: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-3359-y>
58. Cashman KD. Diet, Nutrition, and Bone Health. *J Nutr.* 1 de noviembre de 2007;137(11):2507S-2512S.
59. Specker B, Thiex NW, Sudhagoni RG. Does Exercise Influence Pediatric Bone? A Systematic Review. *Clin Orthop Relat Res.* noviembre de 2015;473(11):3658-72.
60. Müller R, Rügsegger P. Three-dimensional finite element modelling of non-invasively assessed trabecular bone structures. *Med Eng Phys.* marzo de 1995;17(2):126-33.
61. Cody DD, Gross GJ, J. Hou F, Spencer HJ, Goldstein SA, P. Fyhrie D. Femoral strength is better predicted by finite element models than QCT and DXA. *J Biomech.* octubre de 1999;32(10):1013-20.

62. Prendergast P. Finite element models in tissue mechanics and orthopaedic implant design. Clin Biomech. septiembre de 1997;12(6):343-66.
63. Grassi L, Isaksson H. Extracting accurate strain measurements in bone mechanics: A critical review of current methods. J Mech Behav Biomed Mater. octubre de 2015;50:43-54.
64. Lang TF, Keyak JH, Heitz MW, Augat P, Lu Y, Mathur A, et al. Volumetric quantitative computed tomography of the proximal femur: Precision and relation to bone strength. Bone. julio de 1997;21(1):101-8.
65. Peters WH, Ranson WF. Digital Imaging Techniques In Experimental Stress Analysis. Opt Eng [Internet]. 1 de junio de 1982 [citado 13 de febrero de 2018];21(3). Disponible en: <http://opticalengineering.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/12.7972925>
66. Liu L, Morgan EF. Accuracy and precision of digital volume correlation in quantifying displacements and strains in trabecular bone. J Biomech. enero de 2007;40(15):3516-20.
67. Cheung AM, Adachi JD, Hanley DA, Kendler DL, Davison KS, Josse R, et al. High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography for the Assessment of Bone Strength and Structure: A Review by the Canadian Bone Strength Working Group. Curr Osteoporos Rep. junio de 2013;11(2):136-46.
68. Zhou B, Wang J, Yu YE, Zhang Z, Nawathe S, Nishiyama KK, et al. High-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) can assess microstructural and biomechanical properties of both human distal radius and tibia: Ex vivo computational and experimental validations. Bone. mayo de 2016;86:58-67.

69. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. BMC Med [Internet]. diciembre de 2011 [citado 2 de febrero de 2018];9(1). Disponible en: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-9-66>
70. Ballester Alfaro JJ, Sueiro Fernández J, Universidad de Cádiz, Servicio de Publicaciones. Biomateriales y sustitutos óseos en traumatología y cirugía ortopédica. Cádiz: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz; 2011.
71. Sheyn D, Shapiro G, Tawackoli W, Jun DS, Koh Y, Kang KB, et al. PTH Induces Systemically Administered Mesenchymal Stem Cells to Migrate to and Regenerate Spine Injuries. Mol Ther. febrero de 2016;24(2):318-30.
72. Atkinson HF, Moyer RF, Yacoub D, Coughlin D, Birmingham TB. Effects of Recombinant Human Growth Hormone for Osteoporosis: Systematic Review and Meta-Analysis. Can J Aging Rev Can Vieil. marzo de 2017;36(01):41-54.
73. Major P, Lortholary A, Hon J, Abdi E, Mills G, Menssen HD, et al. Zoledronic Acid Is Superior to Pamidronate in the Treatment of Hypercalcemia of Malignancy: A Pooled Analysis of Two Randomized, Controlled Clinical Trials. J Clin Oncol. 15 de enero de 2001;19(2):558-67.
74. Berenson JR, Hillner BE, Kyle RA, Anderson K, Lipton A, Yee GC, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guidelines: The Role of Bisphosphonates in Multiple Myeloma. J Clin Oncol. septiembre de 2002;20(17):3719-36.
75. Hillner BE, Ingle JN, Chlebowski RT, Gralow J, Yee GC, Janjan NA, et al. American Society of Clinical Oncology 2003 Update on the

- Role of Bisphosphonates and Bone Health Issues in Women With Breast Cancer. *J Clin Oncol.* noviembre de 2003;21(21):4042-57.
76. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* octubre de 2014;72(10):1938-56.
77. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* septiembre de 2007;38 Suppl 4:S3-6.
78. Andrade JD, Hlady V, Wei A-P, Ho C-H, Lea AS, Jeon SI, et al. Proteins at interfaces: Principles, multivariate aspects, protein resistant surfaces, and direct imaging and manipulation of adsorbed proteins. *Clin Mater.* enero de 1992;11(1-4):67-84.
79. Hedrick TL, Adams JD, Sawyer RG. Implant-associated infections: an overview. *J Long Term Eff Med Implants.* 2006;16(1):83-99.
80. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 12 de noviembre de 1965;150(3698):893-9.
81. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg Off Publ Am Coll Foot Ankle Surg.* octubre de 1996;35(5):413-7.
82. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2008;9(1):11-21.
83. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell.* septiembre de 2008;3(3):301-13.

84. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* junio de 2001;71(6):354-61.
85. Abraham CM. A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments. *Open Dent J.* 16 de mayo de 2014;8(1):50-5.
86. Vallet Regí M. Biomateriales aquí y ahora. Madrid: Editorial Dykinson; 2000.
87. Lavenus S, Louarn G, Layrolle P. Nanotechnology and Dental Implants. *Int J Biomater.* 2010;2010:1-9.
88. Olate S, de Oliveira GR, Jaimes M, Barbosa JR de A-. Recuperación Ósea en Procedimientos de Reconstrucción y Colocación de Implantes. *Int J Morphol.* 2007;25:649-57.
89. Fernández-Fairén M, Gil-Mur FJ. Nuevos materiales en artroplastia total de cadera. *Rev Esp Cir Ortopédica Traumatol.* enero de 2003;47(6):434-42.
90. Moya-Angeler J, Lane JM, Rodriguez JA. Metabolic Bone Diseases and Total Hip Arthroplasty: Preventing Complications. *J Am Acad Orthop Surg.* noviembre de 2017;25(11):725-35.
91. Sansone V. The effects on bone cells of metal ions released from orthopaedic implants. A review. *Clin CASES Miner BONE Metab* [Internet]. 2013 [citado 7 de febrero de 2018]; Disponible en: <http://www.ccmbm.com/common/php/portiere.php?ID=787932401e63c23fe24a7d147de8a96c>
92. Deng Y, Zhu X, Yang J, Jiang H, Yan P. The Effect of Regeneration Techniques on Periapical Surgery With Different Protocols for Different Lesion Types: A Meta-Analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* febrero de 2016;74(2):239-46.

93. Jung U-W, Cha J-K, Vignoletti F, Nuñez J, Sanz J, Sanz M. Simultaneous lateral bone augmentation and implant placement using a particulated synthetic bone substitute around chronic peri-implant dehiscence defects in dogs. J Clin Periodontol. noviembre de 2017;44(11):1172-80.
94. Qian J, Wennerberg A, Albrektsson T. Reasons for Marginal Bone Loss around Oral Implants: Marginal Bone Loss around Oral Implants. Clin Implant Dent Relat Res. diciembre de 2012;14(6):792-807.
95. Muramatsu C, Takahashi R, Hayashi T, Hara T, Fukui T, Katsumata A, et al. Quantitative evaluation of alveolar bone resorption on dental panoramic radiographs by standardized dentition image transformation and probability estimation. En IEEE; 2016 [citado 5 de febrero de 2018]. p. 1038-41. Disponible en: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7590880/>
96. Kahn A, Shlomi B, Levy Y, Better H, Chaushu G. [The use of autogenous block graft for augmentation of the atrophic alveolar ridge]. Refuat Ha-Peh Veba-Shinayim 1993. julio de 2003;20(3):54-64, 102.
97. Rachmiel A, Srouji S, Peled M. Alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis. Int J Oral Maxillofac Surg. diciembre de 2001;30(6):510-7.
98. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. Biomaterials. octubre de 2008;29(29):3973-82.
99. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. Open Dent J. 16 de mayo de 2014;8(1):56-65.

100. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. febrero de 1994;9(1):13-29.
101. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. mayo de 1988;81(5):672-6.
102. Gottlow J. Guided Tissue Regeneration Using Bioresorbable and Non-Resorbable Devices: Initial Healing and Long-Term Results. *J Periodontol*. noviembre de 1993;64(11s):1157-65.
103. Hämmerle CH, Lang NP. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Implants Res*. febrero de 2001;12(1):9-18.
104. Phemister DB. BONE GROWTH AND REPAIR. *Ann Surg*. agosto de 1935;102(2):261-85.
105. Glicenstein J. [History of bone reconstruction]. *Ann Chir Plast Esthet*. junio de 2000;45(3):171-4.
106. Brekke JH, Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 1998;43(4):380-98.
107. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*. marzo de 1998;16(3):247-52.
108. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. diciembre de 2015;81:112-21.

109. Anusuya GS, Kandasamy M, Jacob Raja SA, Sabarinathan S, Ravishankar P, Kandhasamy B. Bone morphogenetic proteins: Signaling periodontal bone regeneration and repair. J Pharm Bioallied Sci. octubre de 2016;8(Suppl 1):S39-41.
110. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Bigham-Sadegh A. Bone morphogenetic proteins: A powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations: Bone Morphogenetic Proteins in Bone Healing. BioFactors. 10 de septiembre de 2014;40(5):459-81.
111. Flores Sánchez X, Guerra Farfan E, Corona Pérez-Cardona P, Amat Mateu C, Nardi Vilardaga J. Cirugía reconstructiva del aparato locomotor, nuevas técnicas y opciones terapéuticas. Rev Esp Cir Ortopédica Traumatol. mayo de 2010;54:31-8.
112. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. junio de 1998;85(6):638-46.
113. Roselló-Camps À, Monje A, Lin G-H, Khoshkam V, Chávez-Gatty M, Wang H-L, et al. Platelet-rich plasma for periodontal regeneration in the treatment of intrabony defects: a meta-analysis on prospective clinical trials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. noviembre de 2015;120(5):562-74.
114. Hou X, Yuan J, Aisaiti A, Liu Y, Zhao J. The effect of platelet-rich plasma on clinical outcomes of the surgical treatment of periodontal intrabony defects: A systematic review and meta-analysis. BMC Oral Health [Internet]. diciembre de 2016 [citado 5 de febrero de 2018];16(1). Disponible en: <http://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-016-0261-5>

115. Salgado-Peralvo ÁO, Salgado-García Á, Arriba-Fuente L. Nuevas tendencias en regeneración tisular: fibrina rica en plaquetas y leucocitos. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac.* abril de 2017;39(2):91-8.
116. Williams DF. *The Williams Dictionary of Biomaterials* [Internet]. Liverpool: Liverpool University Press; 2011 [citado 25 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://universitypublishingonline.org/ref/id/liverpool/CBO9781846314438>
117. Vallet Regí M, Munuera L. *Biomateriales aquí y ahora*. Madrid: Editorial Dykinson; 2000.
118. Hench LL, Ethridge EC. *Biomaterials: an interfacial approach*. New York: Academic Press; 1982. 385 p. (Biophysics and bioengineering series).
119. Bergmann CP, Stumpf A. Biomaterials. En: *Dental Ceramics* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [citado 25 de diciembre de 2017]. p. 9-13. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38224-6_2
120. Hariprasad Ananth, Kundapur Vinaya, Mohammed H. S. A Review on Biomaterials in Dental Implantology. *Int J Biomed Sci.* septiembre de 2015;11(3):113-20.
121. Hilton KR, Dorr LD, Wan Z, McPherson EJ. Contemporary total hip replacement with metal on metal articulation. *Clin Orthop.* agosto de 1996;(329 Suppl):S99-105.
122. Wagner M, Wagner H. Preliminary results of uncemented metal on metal stemmed and resurfacing hip replacement arthroplasty. *Clin Orthop.* agosto de 1996;(329 Suppl):S78-88.
123. Weber BG. Experience with the Metasul total hip bearing system. *Clin Orthop.* agosto de 1996;(329 Suppl):S69-77.

124. Srivastav A. An Overview of Metallic Biomaterials for Bone Support and Replacement. En: Laskovski A, editor. Biomedical Engineering, Trends in Materials Science [Internet]. InTech; 2011 [citado 26 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-trends-in-materials-science/an-overview-of-metallic-biomaterials-for-bone-support-and-replacement>
125. Prasad K, Bazaka O, Chua M, Rochford M, Fedrick L, Spoor J, et al. Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities. Materials. 31 de julio de 2017;10(8):884.
126. Prakasam M, Locs J, Salma-Ancane K, Loca D, Largeteau A, Berzina-Cimdina L. Biodegradable Materials and Metallic Implants—A Review. J Funct Biomater. 26 de septiembre de 2017;8(4):44.
127. Ren W, Wu B, Mayton L, Wooley PH. Polyethylene and methyl methacrylate particle-stimulated inflammatory tissue and macrophages up-regulate bone resorption in a murine neonatal calvaria in vitro organ system. J Orthop Res. septiembre de 2002;20(5):1031-7.
128. Dumitriu S, Popa VI, editores. Polymeric biomaterials. 3. ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 2013.
129. Hou S, Xu Q, Tian W, Cui F, Cai Q, Ma J, et al. The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. J Neurosci Methods. octubre de 2005;148(1):60-70.
130. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. Bone. enero de 2015;70:93-101.
131. Barsoum MW. Fundamentals of ceramics. 2. print. Bristol: IOP; 2003. 603 p. (Series in materials science and engineering).

132. Habraken WJEM, Wolke JGC, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* mayo de 2007;59(4-5):234-48.
133. Sedel L, Nizard RS, Kerboull L, Witvoet J. Alumina-alumina hip replacement in patients younger than 50 years old. *Clin Orthop.* enero de 1994;(298):175-83.
134. Yoo JJ, Kim Y-M, Yoon KS, Koo K-H, Song WS, Kim HJ. Alumina-on-Alumina Total Hip ArthroplastyA Five-Year Minimum Follow-up Study. *J Bone Jt Surg Am* [Internet]. 1 de marzo de 2005 [citado 30 de enero de 2018];87(3). Disponible en: <http://jbjs.org/cgi/doi/10.2106/JBJS.D.01753>
135. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* octubre de 2000;15(5):675-90.
136. Gracis S, Thompson V, Ferencz J, Silva N, Bonfante E. A New Classification System for All-Ceramic and Ceramic-like Restorative Materials. *Int J Prosthodont.* mayo de 2016;28(3):227-35.
137. AL-Haddad A, Che Ab Aziz ZA. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater.* 2016;2016:1-10.
138. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Andreas Spittler, Lucas T, Samorapoompichit P, et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater.* noviembre de 1998;14(6):429-40.
139. Hofbauer MH, Delmonte RJ, Scripps ML. Autogenous bone grafting. *J Foot Ankle Surg.* septiembre de 1996;35(5):386-90.

140. Myeroff C, Archdeacon M. Autogenous Bone Graft: Donor Sites and Techniques: J Bone Jt Surg-Am Vol. diciembre de 2011;93(23):2227-36.
141. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma. 1989;3(3):192-5.
142. Keating JF, McQueen MM. SUBSTITUTES FOR AUTOLOGOUS BONE GRAFT IN ORTHOPAEDIC TRAUMA. J Bone Jt Surg. 1 de enero de 2001;83(1):3-8.
143. Tuchman A, Brodke DS, Youssef JA, Meisel H-J, Dettori JR, Park J-B, et al. Autograft versus Allograft for Cervical Spinal Fusion: A Systematic Review. Glob Spine J. febrero de 2017;7(1):59-70.
144. Inclan A. THE USE OF PRESERVED BONE GRAFT IN ORTHOPAEDIC SURGERY. JBJS [Internet]. 1942;24(1). Disponible en: https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/1942/24010/THE_USE_OF_PRESERVED_BONE_GRAFT_IN_ORTHOPAEDIC.6.aspx
145. Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. [Internet]. Boletín Oficial del Estado. Sec. I. Disposiciones generales jul 5, 2014 p. 52716-63. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2014-7065>
146. Henman P, Finlayson D. Ordering allograft by weight. J Arthroplasty. abril de 2000;15(3):368-71.
147. Friedlaender GE, Strong DM, Tomford WW, Mankin HJ. LONG-TERM FOLLOW-UP OF PATIENTS WITH OSTEOCHONDRAL ALLOGRAFTS. Orthop Clin North Am. octubre de 1999;30(4):583-8.

148. Darby I. Periodontal materials: Periodontal materials. Aust Dent J. junio de 2011;56:107-18.
149. Bose S, Bandyopadhyay A, editores. Materials and devices for bone disorders. Amsterdam Boston Heidelberg: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2017. 543 p.
150. Van der Stok J, Van Lieshout EMM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands – A systematic literature review. Acta Biomater. febrero de 2011;7(2):739-50.
151. Chou Y, Huang W, Dunn J, Miller T, Wu B. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. Biomaterials. enero de 2005;26(3):285-95.
152. Hing KA, Annaz B, Saeed S, Revell PA, Buckland T. Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. J Mater Sci Mater Med. mayo de 2005;16(5):467-75.
153. Blecha LD, Rakotomanana L, Razafimahery F, Terrier A, Pioletti DP. Mechanical interaction between cells and fluid for bone tissue engineering scaffold: Modulation of the interfacial shear stress. J Biomech. marzo de 2010;43(5):933-7.
154. Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. J Mater Sci Mater Med. marzo de 1999;10(3):169-76.
155. Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: precipitate formation during setting reactions. J Mater Sci Mater Med. marzo de 1999;10(3):177-83.
156. Hench LL. The story of Bioglass®. J Mater Sci Mater Med. noviembre de 2006;17(11):967-78.

157. Hench LL, Paschall HA. Histochemical responses at a biomaterial's interface. J Biomed Mater Res. 1974;8(3):49-64.
158. Pinto KNZ, Tim CR, Crovace MC, Matsumoto MA, Parizotto NA, Zanotto ED, et al. Effects of Biosilicate[®] Scaffolds and Low-Level Laser Therapy on the Process of Bone Healing. Photomed Laser Surg. junio de 2013;31(6):252-60.
159. Pryor L, Gage E, Langevin C-J, Herrera F, Breithaupt A, Gordon C, et al. Review of Bone Substitutes. Craniomaxillofacial Trauma Reconstr. octubre de 2009;2(03):151-60.
160. Coetzee AS. Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate. Arch Otolaryngol Chic Ill 1960. julio de 1980;106(7):405-9.
161. López J, Alarcón M. Sulfato de calcio: propiedades y aplicaciones clínicas. Rev Clínica Periodoncia Implantol Rehabil Oral. diciembre de 2011;4(3):138-43.
162. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. Biomaterials. diciembre de 1999;20(23-24):2287-303.
163. Knabe C, Stiller M, Berger G, Reif D, Gildenhaar R, Howlett CR, et al. The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone-related genes and proteins in vitro: Bone-related protein expression on glass-ceramics. Clin Oral Implants Res. 13 de agosto de 2004;16(1):119-27.
164. Cazalbou S, Eichert D, Ranz X, Drouet C, Combes C, Harmand MF, et al. Ion exchanges in apatites for biomedical application. J Mater Sci Mater Med. mayo de 2005;16(5):405-9.
165. LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. Chem Rev. 12 de noviembre de 2008;108(11):4742-53.

166. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angew Chem Int Ed.* 2 de septiembre de 2002;41(17):3130-46.
167. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot M., Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* febrero de 2001;30(1):58-62.
168. Wikesjo UME, Lim WH, Thomson RC, Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: gingival tissue occlusion, a critical requirement for GTR? *J Clin Periodontol.* julio de 2003;30(7):655-64.
169. von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res.* agosto de 2006;17(4):359-66.
170. Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1990;24(1):13-9.
171. Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent.* abril de 1994;14(2):166-80.
172. Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, Howanietz N, Gorlitzer M, Froeschl A, et al. Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg.* febrero de 2009;49(2):352-62.
173. Bunyaratavej P, Wang H-L. Collagen Membranes: A Review. *J Periodontol.* febrero de 2001;72(2):215-29.

174. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertzen M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. Clin Oral Implants Res. agosto de 2004;15(4):443-9.
175. von Arx T, Broggini N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. Int J Oral Maxillofac Implants. diciembre de 2005;20(6):843-53.
176. Buser D, Hoffmann B, Bernard J, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. Clin Oral Implants Res. junio de 1998;9(3):137-50.
177. AO Research Institute, AO Foundation, Clavadelerstrasse 8, Davos, Switzerland, Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. Eur Cell Mater. 2 de marzo de 2007;13:1-10.
178. Stenderup K. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells,. Bone. diciembre de 2003;33(6):919-26.
179. Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. Int J Implant Dent [Internet]. diciembre de 2017 [citado 30 de enero de 2018];3(1). Disponible en: <http://journalimplantdent.springeropen.com/articles/10.1186/s40729-017-0084-4>

180. Chiapasco M, Abati S, Romeo E, Vogel G. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. *Clin Oral Implants Res.* agosto de 1999;10(4):278-88.
181. Chiriac G, Herten M, Schwarz F, Rothamel D, Becker J. Autogenous bone chips: influence of a new piezoelectric device (PiezosurgeryR) on chip morphology, cell viability and differentiation. *J Clin Periodontol.* septiembre de 2005;32(9):994-9.
182. Deeb GR, Laskin DM, Deeb JG. Simultaneous Impacted Third Molar Extraction and Lateral Ramus Block Graft Harvest for Horizontal Ridge Augmentation: A Case Series. *J Oral Maxillofac Surg.* marzo de 2017;75(3):509-13.
183. Gruber R, Baron M, Busenlechner D, Kandler B, Fuerst G, Watzek G. Proliferation and osteogenic differentiation of cells from cortical bone cylinders, bone particles from mill, and drilling dust. *J Oral Maxillofac Surg.* febrero de 2005;63(2):238-43.
184. Gellrich N-C, Held U, Schoen R, Pailing T, Schramm A, Bormann K-H. Alveolar Zygomatic Buttress: A New Donor Site for Limited Preimplant Augmentation Procedures. *J Oral Maxillofac Surg.* febrero de 2007;65(2):275-80.
185. Block MS, Degen M. Horizontal ridge augmentation using human mineralized particulate bone: Preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg.* septiembre de 2004;62:67-72.
186. Boyan BD, Ranly DM, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z. Osteoinductive Ability of Human Allograft Formulations. *J Periodontol.* septiembre de 2006;77(9):1555-63.

187. Weibrich G, Trettin R, Gnoth SH, Götz H, Duschner H, Wagner W. Bestimmung der Größe der spezifischen Oberfläche von Knochenersatzmaterialien mittels Gasadsorption. Mund Kiefer Gesichtschir. mayo de 2000;4(3):148-52.
188. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res. abril de 1997;8(2):117-24.
189. Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 9 de diciembre de 2008;90B(1):171-81.
190. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. Biomaterials. junio de 2001;22(12):1599-606.
191. Ozer K, Chung KC. The Use of Bone Grafts and Substitutes in the Treatment of Distal Radius Fractures. Hand Clin. mayo de 2012;28(2):217-23.
192. Roy DM, Linnehan SK. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. Nature. 25 de enero de 1974;247(5438):220-2.
193. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy MJ. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. Tissue Eng. enero de 2005;11(1-2):1-18.
194. Shue L, Yufeng Z, Mony U. Biomaterials for periodontal regeneration: A review of ceramics and polymers. Biomater. octubre de 2012;2(4):271-7.

195. LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med.* marzo de 2003;14(3):201-9.
196. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury.* diciembre de 2000;31 Suppl 4:37-47.
197. Vitale-Brovarone C, Verné E, Robiglio L, Martinasso G, Canuto RA, Muzio G. Biocompatible glass–ceramic materials for bone substitution. *J Mater Sci Mater Med.* enero de 2008;19(1):471-8.
198. Götz W, Gerber T, Michel B, Lossdörfer S, Henkel K-O, Heinemann F. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (NanoBone[®]) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clin Oral Implants Res.* octubre de 2008;19(10):1016-26.
199. Allison DC, Assistant Director and Attending Surgeon, Division of Musculoskeletal Oncology, Lindberg AW, Resident Surgeon, Department of Orthopedics, University of Southern California and Los Angeles County Medical Center, Samimi B, Attending Surgeon, Samimi Orthopedic Group, West Covina, et al. A Comparison of Mineral Bone Graft Substitutes for Bone Defects. *Oncol Hematol Rev US.* 2011;07(01):38.
200. Habibovic P, Kruijt MC, Juhl MV, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, et al. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res.* 10 de abril de 2008;26(10):1363-70.
201. Overgaard S, Lind M, Glerup H, Grundvig S, Bünger C, Søballe K. Hydroxyapatite and fluorapatite coatings for fixation of weight loaded implants. *Clin Orthop.* marzo de 1997;(336):286-96.

202. Chang MC, Ikoma T, Kikuchi M, Tanaka J. Preparation of a porous hydroxyapatite/collagen nanocomposite using glutaraldehyde as a crosslinkage agent. Vol. 20. 2001. 1199 p.
203. Silver I. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts*1. Exp Cell Res. abril de 1988;175(2):266-76.
204. Klawitter JJ, Bagwell JG, Weinstein AM, Sauer BW, Pruitt JR. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. J Biomed Mater Res. marzo de 1976;10(2):311-23.
205. Osborn JF, Newesely H. The material science of calcium phosphate ceramics. Biomaterials. abril de 1980;1(2):108-11.
206. Kim H-M, Himeno T, Kawashita M, Kokubo T, Nakamura T. The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. J R Soc Interface. 22 de noviembre de 2004;1(1):17-22.
207. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. Biomaterials. junio de 2003;24(13):2161-75.
208. Frame JW, Brady CL, Browne RM. Augmentation of the edentulous mandible using bone and hydroxyapatite: a comparative study in dogs. Int J Oral Surg. 1981;10(Suppl 1):88-92.
209. Grandfield K, Palmquist A, Engqvist H, Thomsen P. Resolving the CaP-bone interface: A review of discoveries with light and electron microscopy. Biomatter. enero de 2012;2(1):15-23.
210. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for

- osteoidinduction by biomaterials. *Biomaterials*. junio de 2005;26(17):3565-75.
211. Szcześ A, Hołysz L, Chibowski E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*. noviembre de 2017;249:321-30.
212. Browaeys H, Bouvry P, De Bruyn H. A Literature Review on Biomaterials in Sinus Augmentation Procedures. *Clin Implant Dent Relat Res*. septiembre de 2007;9(3):166-77.
213. Lambert F, Lecloux G, Rompen E. One-step approach for implant placement and subantral bone regeneration using bovine hydroxyapatite: a 2- to 6-year follow-up study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. junio de 2010;25(3):598-606.
214. Canullo L, Wiel Marin G, Tallarico M, Canciani E, Musto F, Dellavia C. Histological and Histomorphometrical Evaluation of Postextractive Sites Grafted with Mg-Enriched Nano-Hydroxyapatite: A Randomized Controlled Trial Comparing 4 Versus 12 Months of Healing: Biomimetic Hydroxyapatite in Site Preservation. *Clin Implant Dent Relat Res*. octubre de 2016;18(5):973-83.
215. Laurito D, Lollobrigida M, Gianno F, Bosco S, Lamazza L, De Biase A. Alveolar Ridge Preservation with nc-HA and d-PTFE Membrane: A Clinical, Histologic, and Histomorphometric Study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. marzo de 2017;37(2):283-90.
216. Figliuzzi MM. Histological evaluation of a biomimetic material in bone regeneration after one year from graft. *Ann Stomatol (Roma)* [Internet]. 2014 [citado 31 de enero de 2018]; Disponible en:
<http://www.annalidistomatologia.com/common/php/portiere.php?ID=996d0bcbf0d9d95e24ee669b2ce1e903>

217. Figliuzzi Michele M. Biomimetic hydroxyapatite used in the treatment of periodontal intrabony pockets: clinical and radiological analysis. Ann Stomatol (Roma) [Internet]. 2016 [citado 31 de enero de 2018]; Disponible en: <http://www.annalidistomatologia.com/common/php/portiere.php?ID=96d66cb79633cd602208faf87736b58a>
218. Mistry S, Datta S, Kundu D, Basu D. Effects of bioactive glass, hydroxyapatite and bioactive glass - Hydroxyapatite composite graft particles in the treatment of infrabony defects. J Indian Soc Periodontol. 2012;16(2):241.
219. Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J. Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostimtm) or a bovine-derived xenograft (Bio-Osstm) in combination with a collagen membrane (Bio-Gidetm). A case series. J Clin Periodontol. julio de 2006;33(7):491-9.
220. Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: treatment of peri-implantitis. Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 18 de enero de 2012 [citado 31 de enero de 2018]; Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004970.pub5>
221. Gali RS, Devireddy SK, Mohan Rao N, Kishore Kumar RV, Kanubaddy SR, Dasari M, et al. Autogenous Bone Marrow Aspirate Coated Synthetic Hydroxyapatite for Reconstruction of Maxillo-Mandibular Osseous Defects: A Prospective Study. J Maxillofac Oral Surg. marzo de 2017;16(1):71-8.
222. Yao Q, Wei B, Guo Y, Jin C, Du X, Yan C, et al. Design, construction and mechanical testing of digital 3D anatomical data-based PCL-HA bone tissue engineering scaffold. J Mater Sci Mater Med

- [Internet]. enero de 2015 [citado 31 de enero de 2018];26(1). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-014-5360-8>
223. Senatov FS, Niaza KV, Zadorozhnyy MY, Maksimkin AV, Kaloshkin SD, Estrin YZ. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater.* abril de 2016;57:139-48.
224. Trachtenberg JE, Placone JK, Smith BT, Fisher JP, Mikos AG. Extrusion-based 3D printing of poly(propylene fumarate) scaffolds with hydroxyapatite gradients. *J Biomater Sci Polym Ed.* 13 de abril de 2017;28(6):532-54.
225. Farokhi M, Mottaghitalab F, Ai J, Shokrgozar MA. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *Int J Pharm.* septiembre de 2013;454(1):216-25.
226. Nandi SK, Kundu B, Mukherjee J, Mahato A, Datta S, Balla VK. Converted marine coral hydroxyapatite implants with growth factors: In vivo bone regeneration. *Mater Sci Eng C.* abril de 2015;49:816-23.
227. Ding Z, Fan Z, Huang X, Lu Q, Xu W, Kaplan DL. Silk-Hydroxyapatite Nanoscale Scaffolds with Programmable Growth Factor Delivery for Bone Repair. *ACS Appl Mater Interfaces.* 21 de septiembre de 2016;8(37):24463-70.
228. Martínez-Vázquez FJ, Cabañas MV, Paris JL, Lozano D, Vallet-Regí M. Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatin scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration. *Acta Biomater.* marzo de 2015;15:200-9.

229. Ghorbani FM, Kaffashi B, Shokrollahi P, Seyedjafari E, Ardeshirylajimi A. PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation. Carbohydr Polym. marzo de 2015;118:133-42.
230. Zhou K, Dong C, Zhang X, Shi L, Chen Z, Xu Y, et al. Preparation and characterization of nanosilver-doped porous hydroxyapatite scaffolds. Ceram Int. enero de 2015;41(1):1671-6.
231. Khalid P, Hussain M, Rekha P, Arun A. Carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite composite and their interaction with human osteoblast in vitro. Hum Exp Toxicol. mayo de 2015;34(5):548-56.
232. Maleki-Ghaleh H, Aghaie E, Nadernezhad A, Zargarzadeh M, Khakzad A, Shakeri MS, et al. Influence of Fe₃O₄ Nanoparticles in Hydroxyapatite Scaffolds on Proliferation of Primary Human Fibroblast Cells. J Mater Eng Perform. junio de 2016;25(6):2331-9.
233. Narayanan R, Seshadri SK, Kwon TY, Kim KH. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. abril de 2008;85B(1):279-99.
234. Snyders R, Bousser E, Music D, Jensen J, Hocquet S, Schneider JM. Influence of the Chemical Composition on the Phase Constitution and the Elastic Properties of RF-Sputtered Hydroxyapatite Coatings. Plasma Process Polym. 7 de febrero de 2008;5(2):168-74.
235. Guimond-Lischer S, Ren Q, Braissant O, Gruner P, Wampfler B, Maniura-Weber K. Vacuum plasma sprayed coatings using ionic silver doped hydroxyapatite powder to prevent bacterial

- infection of bone implants. *Biointerphases*. marzo de 2016;11(1):011012.
236. Gambardella A, Bianchi M, Kaciulis S, Mezzi A, Brucale M, Cavallini M, et al. Magnetic hydroxyapatite coatings as a new tool in medicine: A scanning probe investigation. *Mater Sci Eng C*. mayo de 2016;62:444-9.
237. Singh RK, Kim T-H, Patel KD, Mahapatra C, Dashnyam K, Kang MS, et al. Novel Hybrid Nanorod Carriers of Fluorescent Hydroxyapatite Shelled with Mesoporous Silica Effective for Drug Delivery and Cell Imaging. Bose S, editor. *J Am Ceram Soc*. octubre de 2014;97(10):3071-6.
238. Kolanthai E, Ganesan K, Eppler M, Kalkura SN. Synthesis of nanosized hydroxyapatite/agarose powders for bone filler and drug delivery application. *Mater Today Commun*. septiembre de 2016;8:31-40.
239. Wang S, Guo Z. Rhombohedral Hydroxyapatite with Mesoporous Architecture for pH-Responsive Drug Delivery. *Chem Lett*. 5 de marzo de 2015;44(3):279-81.
240. Wan Y, Cui T, Xiong G, Li W, Tu J, Zhu Y, et al. Magnetic lamellar nanohydroxyapatite as a novel nanocarrier for controlled delivery of 5-fluorouracil. *Ceram Int*. abril de 2017;43(6):4957-64.
241. Horch H-H, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb®) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*. agosto de 2006;35(8):708-13.
242. Palti A, Hoch T. A concept for the treatment of various dental bone defects. *Implant Dent*. 2002;11(1):73-8.

243. Peters F, Reif D. Functional Materials for Bone Regeneration from Beta-Tricalcium Phosphate. *Mater Werkst.* abril de 2004;35(4):203-7.
244. Wang C, Duan Y, Markovic B, Barbara J, Howlett CR, Zhang X, et al. Phenotypic expression of bone-related genes in osteoblasts grown on calcium phosphate ceramics with different phase compositions. *Biomaterials.* junio de 2004;25(13):2507-14.
245. Albee FH. STUDIES IN BONE GROWTH: TRIPLE CALCIUM PHOSPHATE AS A STIMULUS TO OSTEOGENESIS. *Ann Surg.* enero de 1920;71(1):32-9.
246. Franch J, Díaz-Bertrana C, Lafuente P, Fontecha P, Durall I. Beta-tricalcium phosphate as a synthetic cancellous bone graft in veterinary orthopaedics: a retrospective study of 13 clinical cases. *Vet Comp Orthop Traumatol VCOT.* 2006;19(4):196-204.
247. Liu B, Lun D. Current Application of β -tricalcium Phosphate Composites in Orthopaedics: β -TCP Composites in Orthopaedics. *Orthop Surg.* agosto de 2012;4(3):139-44.
248. Guillaume B. Filling bone defects with β -TCP in maxillofacial surgery: A review. *Morphologie.* septiembre de 2017;101(334):113-9.
249. Arbez B, Libouban H. Behavior of macrophage and osteoblast cell lines in contact with the β -TCP biomaterial (beta-tricalcium phosphate). *Morphologie.* septiembre de 2017;101(334):154-63.
250. Li Y, Jiang T, Zheng L, Zhao J. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by three calcium phosphate ceramic (CaP) powders: A comparative study. *Mater Sci Eng C.* noviembre de 2017;80:296-300.

251. Lenihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, et al. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone*. junio de 2005;36(6):1086-93.
252. Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg Br*. enero de 1988;70(1):17-22.
253. Zhu M, Wang H, Liu J, He H, Hua X, He Q, et al. A mesoporous silica nanoparticulate/ β -TCP/BG composite drug delivery system for osteoarticular tuberculosis therapy. *Biomaterials*. marzo de 2011;32(7):1986-95.
254. Fahimipour F, Rasoulianboroujeni M, Dashtimoghadam E, Khoshroo K, Tahriri M, Bastami F, et al. 3D printed TCP-based scaffold incorporating VEGF-loaded PLGA microspheres for craniofacial tissue engineering. *Dent Mater*. noviembre de 2017;33(11):1205-16.
255. Călin C, Pătrașcu I. Growth factors and beta-tricalcium phosphate in the treatment of periodontal intraosseous defects: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Arch Oral Biol*. junio de 2016;66:44-54.
256. Cömert Kılıç S, Güngörmüş M, Parlak SN. Histologic and histomorphometric assessment of sinus-floor augmentation with beta-tricalcium phosphate alone or in combination with pure-platelet-rich plasma or platelet-rich fibrin: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. octubre de 2017;19(5):959-67.
257. Dahl M, Jørgensen NR, Hørberg M, Pinholt EM. Carriers in mesenchymal stem cell osteoblast mineralization—State-of-the-art. *J Cranio-Maxillofac Surg*. enero de 2014;42(1):41-7.

258. Stavropoulos A, Becker J, Capsius B, Açil Y, Wagner W, Terheyden H. Histological evaluation of maxillary sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5-coated β -tricalcium phosphate: results of a multicenter randomized clinical trial: Histology from sinuses grafted with rhGDF-5/-TCP. J Clin Periodontol. octubre de 2011;38(10):966-74.
259. Luvizuto ER, de Oliveira JCS, Gomes-Ferreira PHS, Pereira CCS, Faverani LP, Antoniali C, et al. Immunohistochemical response in rats of beta-tricalcium phosphate (TCP) with or without BMP-2 in the production of collagen matrix critical defects. Acta Histochem. abril de 2017;119(3):302-8.
260. Maroo S, Murthy KR. Treatment of Periodontal Intrabony Defects Using β -TCP Alone or in Combination with rhPDGF-BB: A Randomized Controlled Clinical and Radiographic Study. Int J Periodontics Restorative Dent. noviembre de 2014;34(6):841-7.
261. Shujaa Addin A, Akizuki T, Hoshi S, Matsuura T, Ikawa T, Fukuba S, et al. Biodegradable gelatin/beta-tricalcium phosphate sponges incorporating recombinant human fibroblast growth factor-2 for treatment of recession-type defects: A split-mouth study in dogs. J Periodontal Res. octubre de 2017;52(5):863-71.
262. Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. Biomaterials. diciembre de 2002;23(23):4493-502.
263. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. agosto de 2008;106(2):203-9.

264. Janko M, Sahm J, Schaible A, Brune JC, Bellen M, Schroder K, et al. Comparison of three different types of scaffolds preseeded with human bone marrow mononuclear cells on the bone healing in a femoral critical size defect model of the athymic rat. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2 de octubre de 2017 [citado 2 de febrero de 2018]; Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.2484>
265. Suba Z, Takács D, Gyulai-Gaál S, Kovács K. Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. diciembre de 2004;19(6):832-8.
266. Jensen SS, Broggini N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*. junio de 2006;17(3):237-43.
267. Kiliç S, Güngörmüş M. Cone Beam Computed Tomography Assessment of Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Beta-Tricalcium Phosphate Alone or in Combination with Platelet-Rich Plasma: A Randomized Clinical Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. noviembre de 2016;31(6):1367-75.
268. Tanaka T, Komaki H, Chazono M, Kitasato S, Kakuta A, Akiyama S, et al. Basic research and clinical application of beta-tricalcium phosphate (β -TCP). *Morphologie*. septiembre de 2017;101(334):164-72.
269. Zerbo IR, Bronckers ALJJ, Lange G de, Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous β -tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials*. abril de 2005;26(12):1445-51.

270. Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK, Kubota E, Abiko Y. Transcriptome analysis of β -TCP implanted in dog mandible. Bone. abril de 2011;48(4):864-77.
271. Pereira RS, Gorla LF, Boos FBJD, Okamoto R, Garcia Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: histomorphometric study and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF. Int J Oral Maxillofac Surg. abril de 2017;46(4):503-10.
272. Chou C-T, Bhawal UK, Watanabe N, Kuboyama N, Chang W-J, Lee S-Y, et al. Expression of caveolin-1 in the early phase of beta-TCP implanted in dog mandible. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. julio de 2013;101B(5):804-12.
273. Hayashi M, Takahashi T, Kawaguchi K, Watanabe T, Zhao J, Abiko Y. Connexin 43 expression at an early stage in dog mandibles by β -TCP. Dent Mater J. 2011;30(1):58-65.
274. Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, et al. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. Int J Oral Maxillofac Implants. junio de 2004;19(3):357-68.
275. Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, et al. Bone formation and resorption of highly purified β -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. Biomaterials. octubre de 2005;26(28):5600-8.
276. Ye F, Lu X, Lu B, Wang J, Shi Y, Zhang L, et al. A long-term evaluation of osteoinductive HA/ β -TCP ceramics in vivo: 4.5 years study in pigs. J Mater Sci Mater Med. 15 de noviembre de 2007;18(11):2173-8.

277. Alam S, Ueki K, Marukawa K, Ohara T, Hase T, Takazakura D, et al. Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. enero de 2007;103(1):16-26.
278. Frota R, Da Silva-Júnior V-A, Teixeira M, Sobral A-P-V, Emanuel-Dias-de Oliveira e Silva null, Da Silveira M-M-F, et al. Histological evaluation of bone repair using β -tricalcium phosphate. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal*. 1 de marzo de 2011;16(2):e190-194.
279. Lee DSH, Pai Y, Chang S, Kim DH. Microstructure, physical properties, and bone regeneration effect of the nano-sized β -tricalcium phosphate granules. *Mater Sci Eng C*. enero de 2016;58:971-6.
280. Zerbo IR, Zijderveld SA, de Boer A, Bronckers ALJJ, de Lange G, ten Bruggenkate CM, et al. Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*. diciembre de 2004;15(6):724-32.
281. Zijderveld SA, Zerbo IR, van den Bergh JPA, Schulten EAJM, ten Bruggenkate CM. Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants*. junio de 2005;20(3):432-40.
282. Martinez A, Franco J, Saiz E, Guitian F. Maxillary sinus floor augmentation on humans: Packing simulations and 8months histomorphometric comparative study of anorganic bone matrix and β -tricalcium phosphate particles as grafting materials. *Mater Sci Eng C*. junio de 2010;30(5):763-9.

283. Szabó G, Huys L, Coulthard P, Maiorana C, Garagiola U, Barabás J, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. junio de 2005;20(3):371-81.
284. Suba Z, Takács D, Matusovits D, Barabás J, Fazekas A, Szabó G. Maxillary sinus floor grafting with β -tricalcium phosphate in humans: density and microarchitecture of the newly formed bone: Maxillary sinus floor grafting with β -tricalcium phosphate. *Clin Oral Implants Res*. febrero de 2006;17(1):102-8.
285. Tetsch J, Tetsch P, Lysek DA. Long-term results after lateral and osteotome technique sinus floor elevation: a retrospective analysis of 2190 implants over a time period of 15 years. *Clin Oral Implants Res*. mayo de 2010;21(5):497-503.
286. Marković A, Mišić T, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Janjić B, Abboud M. Two-Center Prospective, Randomized, Clinical, and Radiographic Study Comparing Osteotome Sinus Floor Elevation with or without Bone Graft and Simultaneous Implant Placement: Osteotome Sinus Floor Elevation with versus without Bone Graft. *Clin Implant Dent Relat Res*. octubre de 2016;18(5):873-82.
287. Horowitz RA, Mazor Z, Miller RJ, Krauser J, Prasad HS, Rohrer MD. Clinical evaluation alveolar ridge preservation with a beta-tricalcium phosphate socket graft. *Compend Contin Educ Dent Jamesburg NJ* 1995. diciembre de 2009;30(9):588-90, 592, 594 passim; quiz 604, 606.
288. Corbella S, Taschieri S, Francetti L, Weinstein R, Del Fabbro M. Histomorphometric Results After Postextraction Socket Healing with Different Biomaterials: A Systematic Review of the

- Literature and Meta-Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. septiembre de 2017;32(5):1001-17.
289. Ogose A, Hotta T, Kawashima H, Kondo N, Gu W, Kamura T, et al. Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *J Biomed Mater Res*. 15 de enero de 2005;72B(1):94-101.
290. Sun J, Shen Q, Lu J. Comparative study of microstructural remodification to porous β -TCP and HA in rabbits. *Chin Sci Bull*. septiembre de 2009;54(17):2962-7.
291. Hwang J-W, Park J-S, Lee J-S, Jung U-W, Kim C-S, Cho K-S, et al. Comparative evaluation of three calcium phosphate synthetic block bone graft materials for bone regeneration in rabbit calvaria. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. noviembre de 2012;100B(8):2044-52.
292. Sakai S, Anada T, Tsuchiya K, Yamazaki H, Margolis HC, Suzuki O. Comparative study on the resorbability and dissolution behavior of octacalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite under physiological conditions. *Dent Mater J*. 2016;35(2):216-24.
293. Mazón P, García-Bernal D, Meseguer-Olmo L, Cragnolini F, De Aza PN. Human mesenchymal stem cell viability, proliferation and differentiation potential in response to ceramic chemistry and surface roughness. *Ceram Int*. junio de 2015;41(5):6631-44.
294. Pecqueux F, Tancret F, Payraudeau N, Bouler JM. Influence of microporosity and macroporosity on the mechanical properties of biphasic calcium phosphate bioceramics: Modelling and experiment. *J Eur Ceram Soc*. marzo de 2010;30(4):819-29.

295. Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials*. agosto de 2005;26(23):4847-55.
296. Khoshniat S, Bourguine A, Julien M, Weiss P, Guicheux J, Beck L. The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals. *Cell Mol Life Sci*. enero de 2011;68(2):205-18.
297. Khoshniat S, Bourguine A, Julien M, Petit M, Pilet P, Rouillon T, et al. Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone*. abril de 2011;48(4):894-902.
298. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. julio de 2005;4(7):518-24.
299. Novikov VI. Concise dictionary of materials science: structure and characterization of polycrystalline materials. Boca Raton: CRC Press; 2003. 272 p.
300. Garcia-Prieto A, Hornez JC, Leriche A, Pena P, Baudín C. Influence of porosity on the mechanical behaviour of single phase β -TCP ceramics. *Ceram Int*. junio de 2017;43(8):6048-53.
301. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc*. julio de 1991;74(7):1487-510.
302. Perez RA, Mestres G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. *Mater Sci Eng C*. abril de 2016;61:922-39.
303. Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a

- centrifugation method. *Biomaterials*. marzo de 2007;28(9):1664-71.
304. Simon JL, Michna S, Lewis JA, Rekow ED, Thompson VP, Smay JE, et al. In vivo bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds assembled by direct ink writing. *J Biomed Mater Res A*. 1 de diciembre de 2007;83A(3):747-58.
305. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. enero de 2010;31(3):461-6.
306. Chang B-S, Lee >>>inits>C.K.>>>fnm>Choon-Ki, Hong K-S, Youn H-J, Ryu H-S, Chung S-S, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*. junio de 2000;21(12):1291-8.
307. Itälä AI, Ylänen HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT. Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(6):679-83.
308. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. septiembre de 2005;26(27):5474-91.
309. Kuboki Y, Jin Q, Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S105-115.
310. von Doernberg M-C, von Rechenberg B, Böhner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, et al. *Biomaterials*. octubre de 2006;27(30):5186-98.

311. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes *in vivo*. J Biomed Mater Res A. 1 de junio de 2008;85A(3):777-86.
312. Tang X, Mao L, Liu J, Yang Z, Zhang W, Shu M, et al. Fabrication, characterization and cellular biocompatibility of porous biphasic calcium phosphate bioceramic scaffolds with different pore sizes. Ceram Int. noviembre de 2016;42(14):15311-8.
313. Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret J-P, Chavassieux P, et al. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. J Mater Sci Mater Med. diciembre de 2003;14(12):1089-97.
314. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. Biomaterials. junio de 2006;27(17):3230-7.
315. Feng B, Jinkang Z, Zhen W, Jianxi L, Jiang C, Jian L, et al. The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture *in vivo*. Biomed Mater. 1 de febrero de 2011;6(1):015007.
316. Phadke A, Hwang Y, Kim SH, Kim SH, Yamaguchi T, Masuda K, et al. Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Eur Cell Mater. 18 de enero de 2013;25:114-29.
317. Im G-I, Ko J-Y, Lee JH. Chondrogenesis of Adipose Stem Cells in a Porous Polymer Scaffold: Influence of the Pore Size. Cell Transplant. noviembre de 2012;21(11):2397-405.

318. Hing KA. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *Int J Appl Ceram Technol*. mayo de 2005;2(3):184-99.
319. AbdulQader ST, Rahman IA, Thirumulu KP, Ismail H, Mahmood Z. Effect of biphasic calcium phosphate scaffold porosities on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Biomater Appl*. abril de 2016;30(9):1300-11.
320. Neo M, Nakamura T, Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T. Apatite formation on three kinds of bioactive material at an early stage in vivo: A comparative study by transmission electron microscopy. *J Biomed Mater Res*. agosto de 1993;27(8):999-1006.
321. Rosa AL, Beloti MM, van Noort R. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. *Dent Mater*. diciembre de 2003;19(8):768-72.
322. Isaac J, Hornez J, Jian D, Descamps M, Hardouin P, Magne D. β -TCP microporosity decreases the viability and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A*. agosto de 2008;86A(2):386-93.
323. Lapczynska H, Galea L, Wüst S, Böhner M, Jerban S, Sweedy A, et al. Effect of grain size and microporosity on the in vivo behaviour of β -tricalcium phosphate scaffolds. *Eur Cell Mater*. 23 de octubre de 2014;28:299-319.
324. Ariizumi T, Ogose A, Kondo N, Kawashima H, Hotta T, Kudo N, et al. The Role of Microstructure of Highly Purified Beta-Tricalcium Phosphate for Osteoinduction in Canine Dorsal Muscles. *J Biomater Nanobiotechnology*. 2013;04(02):189-93.

325. Lu X, Leng Y. Quantitative analysis of osteoblast behavior on microgrooved hydroxyapatite and titanium substrata. J Biomed Mater Res. 1 de septiembre de 2003;66A(3):677-87.
326. Zhang J, Barbieri D, ten Hoopen H, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Yuan H. Microporous calcium phosphate ceramics driving osteogenesis through surface architecture: Surface Architecture Drives Ectopic Osteogenesis. J Biomed Mater Res A. marzo de 2015;103(3):1188-99.
327. Barba A, Diez-Escudero A, Maazouz Y, Rappe K, Espanol M, Montufar EB, et al. Osteoinduction by Foamed and 3D-Printed Calcium Phosphate Scaffolds: Effect of Nanostructure and Pore Architecture. ACS Appl Mater Interfaces. 6 de diciembre de 2017;9(48):41722-36.
328. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. J Biomed Mater Res. febrero de 1998;39(2):190-9.
329. Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, et al. Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. Acta Biomater. diciembre de 2010;6(12):4476-87.
330. Condejo de la Unión Europea; Parlamento Europeo. Reglamento (UE) 2017/745 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios, por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE, el Reglamento (CE) n.º 178/2002 y el Reglamento (CE) n.º 1223/2009 y por el que se derogan las Directivas 90/385/CEE y 93/42/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea. may 5, 2017 p. L 117.

331. Ministerio de Sanidad y Política Social. Real Decreto 1616/2009, de 26 de octubre, que regula los productos sanitarios implantables activos. Boletín Oficial del Estado (BOE) núm. 268. Sec. I. Disposiciones generales. nov 6, 2009 p. 92779-832.
332. International Organization for Standardization. ISO 13779-6:2015 Implants for surgery — Hydroxyapatite — Part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity. 2015 ene p. 10.
333. International Organization for Standardization. ISO 13175-3/2012 Implants for surgery - Calcium phosphates - Part 3: Hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate bone substitutes. 2012 oct p. 13.
334. Trajkovski B, Jaunich M, Müller W-D, Beuer F, Zafiropoulos G-G, Houshmand A. Hydrophilicity, Viscoelastic, and Physicochemical Properties Variations in Dental Bone Grafting Substitutes. Materials. 30 de enero de 2018;11(2):215.
335. Villora JM, Callejas P, Barba MF. Métodos de síntesis y comportamiento térmico del Hidroxiapatito. Bol Soc Esp Cerámica Vidr. 30 de octubre de 2002;41(5):443-50.
336. Franco Vázquez, Jaime. Síntesis y procesamiento de "Beta"-TCP para la fabricación de implantes. Santiago de Compostela; 2004.
337. Zhao B, Xing G yan. Synthesis of beta-Tricalciumphosphate Powder through Aqueous Precipitation Method. En IEEE; 2009 [citado 3 de agosto de 2018]. p. 1-6. Disponible en: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5305604/>
338. Cullity BD. Elements of X-ray diffraction. 3. print. Reading, Mass: Addison-Wesley; 1967. 514 p. (Addison-Wesley series in metallurgy and materials).

339. W. L. Bragg. The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Cristal. Proc Camb Philos Soc. 1912;XVII(nº 1):43-57.
340. Grimshaw RW, Searle AB. The chemistry and physics of clays and allied ceramic materials. 4th ed. rev. New York: Wiley-Interscience; 1971. 1024 p.
341. Van Brakel J, Modrý S, Svatá M. Mercury porosimetry: state of the art. Powder Technol. mayo de 1981;29(1):1-12.
342. Saldarriaga JF, Pablos, A, Aguayo, AT, Aguado, R, Olazar, M. Determinación de la densidad de partícula mediante porosimetría de mercurio para el estudio fluidodinámico de biomasa en lechos móviles. Avances en Ciencias e Ingeniería. junio de 2014;5(2):63-71.
343. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. J Am Chem Soc. febrero de 1938;60(2):309-19.
344. Vitale-Brovarone C, Bairo F, Verné E. High strength bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration. J Mater Sci Mater Med. febrero de 2009;20(2):643-53.
345. Luyten J, Thijs I, Vandermeulen W, Mullens S, Wallaey B, Mortelmans R. Strong ceramic foams from polyurethane templates. Adv Appl Ceram. febrero de 2005;104(1):4-8.
346. Lange FF, Miller KT. Open-Cell, Low-Density Ceramics Fabricated from Reticulated Polymer Substrates. Adv Ceram Mater. octubre de 1987;2(4):827-31.
347. Studart AR, Gonzenbach UT, Tervoort E, Gauckler LJ. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. J Am Ceram Soc. junio de 2006;89(6):1771-89.

348. Sōmiya S. Handbook of advanced ceramics [Internet]. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press; 2003 [citado 17 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.myilibrary.com?id=111938>
349. Rosidah Alias. The Effects of Sintering Temperature Variations on Microstructure Changes of LTCC Substrate. INTECH Open Access Publisher; 2012.
350. Ministerio de la Presidencia. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. [Internet]. Sec. I. Disposiciones generales, «BOE» núm. 34 feb 8, 2013. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2013/02/01/53>
351. Ministerio de Economía y Competitividad. Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. [Internet]. Sec. III. Otras disposiciones, «BOE» núm. 78 abr 1, 2015 p. páginas 27940 a 27973 (34 págs.). Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/o/2015/03/20/ecc566>
352. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. Clin Oral Implants Res. agosto de 2015;26(8):915-30.
353. Sohn J-Y, Park J-C, Um Y-J, Jung U-W, Kim C-S, Cho K-S, et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. J Periodontal Implant Sci. 2010;40(4):180.

354. Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Moreno-López LA, Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal. 1 de abril de 2005;10 Suppl 1:E74-87.
355. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. julio de 2012;9(7):671-5.
356. Liao C-J, Lin F-H, Chen K-S, Sun J-S. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. Biomaterials. octubre de 1999;20(19):1807-13.
357. Ruys AJ, Wei M, Sorrell CC, Dickson MR, Brandwood A, Milthorpe BK. Sintering effects on the strength of hydroxyapatite. Biomaterials. enero de 1995;16(5):409-15.
358. Wang CK, Ju CP, Chern Lin JH. Effect of doped bioactive glass on structure and properties of sintered hydroxyapatite. Mater Chem Phys. mayo de 1998;53(2):138-49.
359. Kothapalli C, Wei M, Vasiliev A, Shaw MT. Influence of temperature and concentration on the sintering behavior and mechanical properties of hydroxyapatite. Acta Mater. noviembre de 2004;52(19):5655-63.
360. Tampieri A, Celotti G, Szontagh F, Landi E. Sintering and characterization of HA and TCP bioceramics with control of their strength and phase purity. J Mater Sci Mater Med. enero de 1997;8(1):29-37.
361. Ramesh S, Tan CY, Tolouei R, Amiriyan M, Purbolaksono J, Sopyan I, et al. Sintering behavior of hydroxyapatite prepared from different routes. Mater Des. febrero de 2012;34:148-54.

362. Tampieri A. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials*. 1 de junio de 2001;22(11):1365-70.
363. Gibson IR, Ke S, Best SM, Bonfield W. Effect of powder characteristics on the sinterability of hydroxyapatite powders. *J Mater Sci Mater Med*. febrero de 2001;12(2):163-71.
364. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*. agosto de 1998;19(16):1419-23.
365. Champion E. Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomater*. abril de 2013;9(4):5855-75.
366. Lafon JP, Champion E, Bernache-Assollant D. Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition. *J Eur Ceram Soc*. enero de 2008;28(1):139-47.
367. Fanovich MA, Porto Lopez JM. Influence of temperature and additives on the microstructure and sintering behaviour of hydroxyapatites with different Ca/P ratios. *J Mater Sci Mater Med*. enero de 1998;9(1):53-60.
368. Mazaheri M, Haghighatzadeh M, Zahedi AM, Sadrnezhaad SK. Effect of a novel sintering process on mechanical properties of hydroxyapatite ceramics. *J Alloys Compd*. marzo de 2009;471(1-2):180-4.
369. Uematsu K, Takagi M, Honda T, Uchida N, Saito K. Transparent Hydroxyapatite Prepared by Hot Isostatic Pressing of Filter Cake. *J Am Ceram Soc*. agosto de 1989;72(8):1476-8.
370. Boilet L, Lardot V, Tricoteaux A, Leriche A, Cambier F, Descamps M. Processing and properties of calcium phosphates bioceramics

- by hot isostatic pressing. Chone J, Guerin J-D, Quaegebeur P, editores. MATEC Web Conf. 2013;7:04020.
371. Agrawal DK. Microwave processing of ceramics. Curr Opin Solid State Mater Sci. octubre de 1998;3(5):480-5.
372. Orrù R, Licheri R, Locci AM, Cincotti A, Cao G. Consolidation/synthesis of materials by electric current activated/assisted sintering. Mater Sci Eng R Rep. 12 de febrero de 2009;63(4-6):127-287.
373. Descamps M, Boilet L, Moreau G, Tricoteaux A, Lu J, Leriche A, et al. Processing and properties of biphasic calcium phosphates bioceramics obtained by pressureless sintering and hot isostatic pressing. J Eur Ceram Soc. julio de 2013;33(7):1263-70.
374. Li Y, Klein CPAT, Zhang X, de Groot K. Relationship between the colour change of hydroxyapatite and the trace element manganese. Biomaterials. octubre de 1993;14(13):969-72.
375. Patel N, Gibson IR, Ke S, Best SM, Bonfield W. Calcining influence on the powder properties of hydroxyapatite. J Mater Sci Mater Med. febrero de 2001;12(2):181-8.
376. Juang H. Effect of calcination on sintering of hydroxyapatite. Biomaterials. noviembre de 1996;17(21):2059-64.
377. Descamps M, Hornez JC, Leriche A. Effects of powder stoichiometry on the sintering of β -tricalcium phosphate. J Eur Ceram Soc. enero de 2007;27(6):2401-6.
378. Oliveira RN, Alencastro FS, Soares GDA. Estudo da significância de variáveis de compactação e sinterização de pastilhas de β -TCP utilizando planejamento de experimentos. Cerâmica. septiembre de 2012;58(347):357-62.

379. Ghosh R, Sarkar R. Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. *Mater Sci Eng C*. octubre de 2016;67:345-52.
380. Martínez-Vázquez F, Pajares A, Guiberteau F, Miranda P. Effect of Polymer Infiltration on the Flexural Behavior of β -Tricalcium Phosphate Robocast Scaffolds. *Materials*. 21 de mayo de 2014;7(5):4001-18.
381. Yoshida K, Kobayashi M, Hyuga H, Kondo N, Kita H, Hashimoto K, et al. Reaction sintering of β -tricalcium phosphates and their mechanical properties. *J Eur Ceram Soc*. enero de 2007;27(10):3215-20.
382. Zhang F, Lin K, Chang J, Lu J, Ning C. Spark plasma sintering of macroporous calcium phosphate scaffolds from nanocrystalline powders. *J Eur Ceram Soc*. enero de 2008;28(3):539-45.
383. Veljović D, Zalite I, Palcevskis E, Smiciklas I, Petrović R, Janačković D. Microwave sintering of fine grained HAP and HAP/TCP bioceramics. *Ceram Int*. marzo de 2010;36(2):595-603.
384. Chen B, Zhang Z, Zhang J, Lin Q, Jiang D. Fabrication and mechanical properties of β -TCP pieces by gel-casting method. *Mater Sci Eng C*. agosto de 2008;28(7):1052-6.
385. Ryu H-S, Hong K-S, Lee J-K, Kim DJ, Lee JH, Chang B-S, et al. Magnesia-doped HA/beta-TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. *Biomaterials*. febrero de 2004;25(3):393-401.
386. Ryu H-S, Youn H-J, Sun Hong K, Chang B-S, Lee C-K, Chung S-S. An improvement in sintering property of β -tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate. *Biomaterials*. febrero de 2002;23(3):909-14.

387. Carbajal L, Caballero A, Sainz MA. Design and processing of ZnO doped tricalcium phosphate based materials: Influence of β/α polymorph phase assemblage on microstructural evolution. J Eur Ceram Soc. marzo de 2012;32(3):569-77.
388. Lin K, Chang J, Lu J, Wu W, Zeng Y. Properties of β -Ca₃(PO₄)₂ bioceramics prepared using nano-size powders. Ceram Int. agosto de 2007;33(6):979-85.
389. Brown O, McAfee M, Clarke S, Buchanan F. Sintering of biphasic calcium phosphates. J Mater Sci Mater Med. agosto de 2010;21(8):2271-9.
390. Lukić M, Stojanović Z, Škapin SD, Maček-Kržmanc M, Mitrić M, Marković S, et al. Dense fine-grained biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics designed by two-step sintering. J Eur Ceram Soc. enero de 2011;31(1-2):19-27.
391. Mehdikhani B, Borhani GH. Densification and Mechanical Behavior of β -Tricalcium Phosphate Bioceramics. Int Lett Chem Phys Astron. julio de 2014;36:37-49.
392. Gross K, Andersons J, Misevicius M, Švirksts J. Traversing Phase Fields towards Nanosized Beta Tricalcium Phosphate. Key Eng Mater. noviembre de 2013;587:97-100.
393. Baino F, Verné E, Vitale-Brovarone C. 3-D high-strength glass-ceramic scaffolds containing fluoroapatite for load-bearing bone portions replacement. Mater Sci Eng C. agosto de 2009;29(6):2055-62.
394. Colombo P. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics. Philos Trans R Soc Math Phys Eng Sci. 15 de enero de 2006;364(1838):109-24.

395. Li SH, De Wijn JR, Layrolle P, De Groot K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* julio de 2002;61(1):109-20.
396. Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *J Biomed Mater Res.* febrero de 2002;59(2):340-8.
397. Wu ZY, Hill RG, Yue S, Nightingale D, Lee PD, Jones JR. Melt-derived bioactive glass scaffolds produced by a gel-cast foaming technique. *Acta Biomater.* abril de 2011;7(4):1807-16.
398. Scalera F, Esposito Corcione C, Montagna F, Sannino A, Maffezzoli A. Development and characterization of UV curable epoxy/hydroxyapatite suspensions for stereolithography applied to bone tissue engineering. *Ceram Int.* diciembre de 2014;40(10):15455-62.
399. Gao C, Deng Y, Feng P, Mao Z, Li P, Yang B, et al. Current Progress in Bioactive Ceramic Scaffolds for Bone Repair and Regeneration. *Int J Mol Sci.* 18 de marzo de 2014;15(3):4714-32.
400. Asa'ad F, Pagni G, Pilipchuk SP, Gianni AB, Giannobile WV, Rasperini G. 3D-Printed Scaffolds and Biomaterials: Review of Alveolar Bone Augmentation and Periodontal Regeneration Applications. *Int J Dent.* 2016;2016:1-15.
401. Chu TM, Halloran JW, Hollister SJ, Feinberg SE. Hydroxyapatite implants with designed internal architecture. *J Mater Sci Mater Med.* junio de 2001;12(6):471-8.
402. Sepulveda P, Binner JGP, Rogero SO, Higa OZ, Bressiani JC. Production of porous hydroxyapatite by the gel-casting of foams and cytotoxic evaluation. *J Biomed Mater Res.* abril de 2000;50(1):27-34.

403. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. febrero de 1994;9(1):13-29.
404. Martínez A, Balboa O, Gasamans I, Otero-Cepeda XL, Guitián F. Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. *Clin Oral Implants Res*. junio de 2015;26(6):623-32.
405. Martínez-González MÁ, Sánchez-Villegas A, Toledo Atucha E, Faulín FJ. *Bioestadística amigable*. Ámsterdam; Barcelona: Elsevier; 2014.
406. Crujeiras Casais RM, Faraldo Roca P. *Manual de estadística básica para ciencias de la salud*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Estadística e Investigación Operativa; 2010.



BIBLIOGRAFÍA GENERADA



Arturo Martinez
 Oscar Balboa
 Iria Gasamans
 Xose Luis Otero-Cepeda
 Francisco Guitian

Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault

Authors' affiliations:

Arturo Martinez, Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, Instituto de Cerámica de Galicia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Oscar Balboa, Iria Gasamans, Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Xose Luis Otero-Cepeda, Bioestadística, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Francisco Guitian, Instituto de Cerámica de Galicia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Corresponding author:

Arturo Martinez
 Estomatología
 Facultad de Medicina y Odontología
 Universidad de Santiago de Compostela
 15782 Santiago de Compostela
 Spain
 Tel.: 34 881816870
 Fax: 34 981564242
 e-mail: arturo.martinez@usc.es

Key words: biomaterials, bone regeneration, bone substitutes, guided tissue, morphometric analysis, regeneration

Abstract

Objectives: This article aims to study differences in the bone formation and the graft resorption of two bone graft substitutes (BGS). Besides, it is our attempt to observe possible qualitative and quantitative differences in the bone repair of the outer layer covered by collagen membrane and the uncovered inner layer in close contact with dura mater.

Material and methods: Twelve rabbits were employed. Deproteinized bovine bone (DBB) and β -tricalcium phosphate (BTCP) were used as BGS. Four subcritical round defects (7 mm) were drilled in the cranial vault, removing both cortical walls. One of the holes was filled with DBB, and other was filled with BTCP. Each symmetrical position to DBB and BTCP was left empty. The whole defect set was covered with a collagen membrane. Histological and morphometric analysis was performed for 1, 4, 8, 16, 32 and 52 weeks. Morphometry measurements were carried out taking into account the whole defect and splitting inner and outer areas.

Results: In DBB sites, a rapid bone growth is observed, linking the remaining particles and integrating them into the bone matrix. Permanence of these DBB particles from week 16 onwards restrains the growth of bone fraction. A greater bone growth appears in areas repaired with BTCP than in those repaired with DBB, both in the outer layer (under-membrane) and the inner layer (over dura mater). In DBB sites, a slower growth is observed in the inner layer, with no significant differences in the final bone fraction at both strata.

Conclusions: Both materials favour the closure of the defects provoked. In both cases, a synergistic effect with the collagen membrane is observed. DBB remains integrated in the bone matrix, while BTCP displays a pattern of highly developed progressive resorption with an outstanding bone fraction development.

In the past years, development and characterization of bone graft substitutes (BGS) have become quite relevant. Availability of enough bone volume plays an important role not only because of aesthetics but also for functional purposes (Chen et al. 2010). Long-term behaviour of dental implants is conditioned by the available amount of alveolar bone (Lekholm et al. 1986). Even though auto grafts are still considered the "golden standard" by some authors (Misch & Dietsh, 1994; Schmitt et al. 2012), they exhibit two relevant drawbacks such as unpredictable resorption (up to a 40%) of the grafted volume (Johanson et al. 2001; Schlegel et al. 2003; Albert et al. 2006), or the fact that

graft harvesting from other parts of the organism with the risk of morbidity appearance, as well as unexpected complications due additional surgery.

Within the BGS, the deproteinized bovine bone (DBB) has exhibited remarkable properties due to its excellent biocompatibility and well-known osteoconductive capability (Guizzardi et al. 1995; Artzi et al. 2004). Although its osteoinductive competence is not so evident (Buser et al. 1998; Busenlechner et al. 2008), this material exhibits long-term permanence inside the matrix of the host bone (Piatelli et al. 1999; Schlegel et al. 2003; Artzi et al. 2004). Although long-term stability goes against what is expected from

Date:
 Accepted 19 January 2014

To cite this article:

Martinez A, Balboa O, Gasamans I, Otero-Cepeda XL, Guitian F. Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. *Clin. Oral Impl. Res.* 26, 2015, 623–632. doi: 10.1111/clr.12349

the ideal biomaterial, which should be totally replaced by host bone, this long-term stability might be an advantage because it can preserve bone volume given that bone remodelling is conditioned by its presence in the bone matrix (Araujo et al. 2011). DBB is a material which possesses a microhierarchical architecture where apatite crystals are organized in the same manner as in host bone, allowing this "nanotexture" and its pore distribution a good colonization by the host (Benezra Rosen et al. 2002) as well as an intimate apposition of new bone growth to residual DBB particles (Piatelli et al. 1999; Jensen et al. 2006). The overall result is a "composite" made of bone and the remaining particles (Hämmerle et al. 1998; Donos et al. 2004; Artzi et al. 2004) with higher density and equal or even better mechanical properties than bone itself (Haas et al. 1998; Orr et al. 2001). This composite is adequate for implant placement (Berglundh & Lindhe 1997). However, this long-term permanence of DBB particles creates some controversy, due to the fact that it has not been elucidated yet whether its presence constrains bone formation and later remodelling.

Another BGS which has also shown an excellent biocompatibility is β -tricalcium phosphate (BTCP). In contrast to DBB case, the synthetic origin of BTCP prevents disease transmission. Similarly, BTCP also shows good biocompatibility and osteoconductive capability (Busenlechner et al. 2008), as well as its possible competence in osteoinductivity (Knabe et al. 2000; Dalcusi et al. 2003; Cheng et al. 2013; Samavedi et al. 2013). BTCP is completely resorbed by host bone. The material resorption seems to be related to its solubility *in vivo* and its degradation by multinucleated cells (Yamada et al. 1997; von Doernberg et al. 2006). The degradation rate of this material can be controlled by modifying the synthetic process, by changing grain size distribution, pore size and porosity, to obtain BTCP particles with controlled porosity, and grain size distribution as well as longer permanence in the host (Ghanaati et al. 2010). The longer permanence of this material will preserve the bone volume and make it less sensitive to bone remodelling. It is also possible that this more stable BTCP could possibly exhibit a porosity which can promote the interaction with bone forming cells and boost its development. Although it has extensively been studied and recognized as the best alternative possible, due to its potential osteogenic capability (Klijn et al. 2010), some of the questions that remain unan-

swered about this material are: 1. Long-term permanence along with its reduced solubility, 2. Its interaction with neo formed bone and the possible existence of stable interfaces (Artzi et al. 2008), 3. The interaction with collagen membranes (Artzi et al. 2004; Schulten et al. 2013).

Retention and surgical stabilization of these materials are commonly achieved by collagen membranes which favour bone regeneration by osteoprogenitor cells, preventing the graft site from being invaded by soft tissue (Tarnow et al. 2000; von Arx et al. 2005). Besides providing an excellent biocompatibility, collagen membranes seem to exhibit osteogenic capabilities (Donos et al. 2004; Taguchi et al. 2004), facilitated by the presence of BGS particles which preserve the volume and avoid membrane collapse (Hämmerle et al. 1998; Hammerle & Jung 2003; Donos et al. 2004). There are scarce works about guided tissue regeneration (GTR) where a bi-cortical defect reparation is studied having each side in contact with different interfaces: one in contact with encephalic membrane and the other side covered with collagen membranes. Nowadays, there are still some doubts about the need of use of collagen membranes along with BGS. Some studies support its synergistic effect (Tarnow et al. 2000; Wang et al. 2002), whereas others consider it as a limited contribution (Artzi et al. 2004), or other even inexistent as a positive interaction (Schulten et al. 2013).

This work intends to shed light over some of the most controversial aspects regarding GTR with these BGS. Therefore, so we have designed a longitudinal and transversal comparison of a DBB and a microporous BTCP with slow solubility. A defect of two walls in the cranial vault was chosen as a model of study this kind of defect, particularly aggressive, was balanced with a subcritical size of the defect. After removing both cortical layers, we presumably obtained a defect with two interfaces with different osteogenic capabilities.

Both BGS were employed alone with no addition of autologous bone to avoid bias in osteogenesis and osteoconductivity due to the presence of the autograft. Our first hypothesis (h0.1) sets the absence of differences in repairing and bone remodelling, neither qualitative nor quantitative, between BGS in the long term. According to our second hypothesis (h0.2), bone growth takes place in a similar manner in the inner and in the outer layer of the defect with independence of the BGS employed.

Material and methods

Study design

Twelve white New Zealand rabbits (Charles River Laboratories, France) weighting 2.5–3 kg were employed. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Santiago de Compostela. The animals were randomly distributed in six groups for the analysis of the defects after healing periods of 1, 4, 8, 16, 32 and 52 weeks.

Surgical protocol

All surgical procedures were done under strict aseptic protocol. The animals were premedicated with diazepam 0.2 ml/kg (Valium 10, Roche), and anaesthetized with ketamine 10 mg/kg (Imalgène 1000, Merial, France) and medetomidina (0.1 mg/kg) (Domtor, Orion, Finland) injected intramuscularly in the hind leg. The animals were shaved from the eyes to the occipital eminence and between the ears. Their skin was disinfected with a povidone-iodine solution 10% (Betadine, Medapharma). Infiltrative anaesthesia 1.8 ml (Ultracain 40/0.005, Normon, Spain,) was injected under the scalp. A midline sagittal incision was made, and skin and periosteum were carefully raised, so vault surface was exposed. Using a bone trephine of 7 mm external diameter (Bontempi, Italy), at low speed rotation and under profuse physiological saline refrigeration (KaVo Intrasurg 300, Karlsruhe, Germany), four no-critical size defects (Hollinger & Kleinschmidt 1990) were prepared: two to each side of the sagittal suture, being careful of not to invade the frontal or occipital sutures (Fig. 1). The tabula externa and tabula interna were carefully sectioned, and the bone discs were carefully removed with a Lucas Carver and a Freer periosteotome (Bontempi, Italy), preserving the integrity of the dura mater. Randomly, in

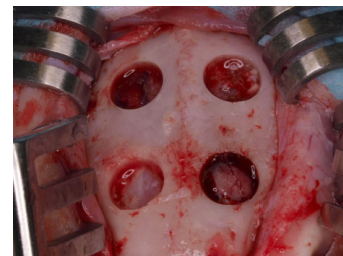


Fig. 1. Four circular defects of 7 mm diameter were prepared in the rabbit vault.

one side, one defect was filled with DBB Bio-Oss [0.25–1 mm Geistlich, Switzerland] and the other was not filled. Similarly, in the other side, and again randomly, one defect was filled with BTCP (KeraOs [0.25–1 mm], Keramat, Spain) while the other was not filled. All the defects were covered with a collagen membrane (Bio-Gide.25 × 25 mm, Geistlich, Switzerland). No additional device was employed to stabilize the membranes. The periosteum was sutured with continuous monofilament resorbable suture (Monocryl3-0, Ethicon, Edinburg, UK). The skin was sutured with interrupted threaded sutures (Vicryl 3-0, Ethicon, Edinburg, UK). Skin was again soaked with povidone solution. An intramuscular injection of benzathine ampicillin (50 mg/kg) and 0.01 ml of prednisone (Urbason 40, Sanofi, Barcelona, Spain) was administered in the immediate postoperative and within the 48 h after surgical procedure metamizol (500 mg/12 h) [Nolotil, Boehringer Ingelheim España] was employed as pain reliever.

Sacrifice

The animals were deeply anesthetized following the same protocol used in surgery and were killed with Nembutal (5 ml/kg). After sacrifice, the cranial vault was removed with a saw and a diamond disc saw under continuous cooling. The galea aponeurotica and the dura mater were not removed. Specimens were immediately immersed in a solution of 7% formaldehyde buffered with phosphate.

Histological sections

The blocks were rinsed in running tap water, and a radiograph was taken to determine the exact location of the defects. Specimens were trimmed and dehydrated in graded series of increasing ethanol concentrations and embedded in acrylic resin (Technovit 7200, Kulzer, Wehrheim, Germany). Sections were made, under copious cooling with ethanol, parallel to the sagittal suture, following Donath and Breuner's method (Donath and Breuner, 1982) (cutting and grinding). Four undecalcified thin sections of about 30 µm were obtained from each defect. The slides were stained with Harris Hematoxyline (Merck, Germany) and Wheatley's modification of trichromatic stain (Chromotrope 2R, Newcomer Supply, USA).

Histomorphometrical evaluation

Histological analysis and photomicrographs were obtained using a light-transmitted microscope (Nikon Optiphot 2pol, NIPPON KOGAKU K.K., Tokyo, Japan) equipped with

a digital camera attached to the microscope (Olympus DP12, Olympus Optical Co. [Europe] GMBH, Hamburg, Germany). The obtained images were processed with ImageJ-1.46r software (Rasband 2012). Morphometric readings were performed at least from three preparations per each defect. When necessary, polarized light microscope was employed to determine the boundaries of the newly formed bone. To study the differences in bone formation in the outer layer versus the inner layer, each defect section was artificially divided into two halves, and morphometry was carried on in the whole defect and in the two halves. All measurements were taken by the same researcher, and boundaries were revised by a second. To determine the reproducibility and the measurement error, ten randomly selected slides were measured three times, in three different days (Bayley & Byrnes 1990). The measurement errors were as follows: bone 0.09%, biomaterial 1% and soft tissue 1.2%.

Statistical analysis

Given the relatively small size of the sample, a Kruskal–Wallis test was employed to make comparisons between the different grafted sites (bone, filler and soft tissue) within time. We have performed post hoc analyses to determine the significance levels of the analysed variables for each time. For the transversal study, taking into account the limitations of the sample, we have chosen a repeated measurement ANOVA due to its robustness. A post hoc of repeated measurements was also performed to analyse the differences between fillers at each time. A Wilcoxon signed rank test was employed to compare the morphometric values from the outer layer data versus the inner layer. The statistical packages employed were Statistix 10.0 (Tallahassee, FL, USA) and the IBM-SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA). The level of significance was set to $P \leq 0.05$.

Results

Histological description

1 week

A persistent blood clot, mainly in the defect centre, is observed as a common histological characteristic in all the examined positions. BGS (Fig 2) are coated by a matrix of proteins, and an outstanding development of mesenchymal undifferentiated tissue between materials with a dense vascular proliferation could also be observed (Fig 3). Small projections of woven bone and a layer of new bone can be seen from

the defect walls, especially in the BTCP samples (Fig 2b). Some multinucleated cells are also visible in close contact with the smooth surface of the BTCP particles. DBB surface is covered by mesenchymal cells; intense cell proliferation and mitosis are seen in the gap between bone walls and graft (Fig 3a). Vascular buds, fibroblasts and mesenchymal cells invade the different collagen membrane layers; some round mononuclear cells could be seen between the collagen bundles. There was no inflammatory reaction, and no inflammatory cell aggregates were observed. Control sites were occupied by granulation tissue in the defect centres, and new bone layers start to grow from the lateral walls.

4 weeks

Deproteinized bovine bone sites: (Fig 2d) there is an increasing presence of trabecular woven bone which emerges from the lateral walls to the centre of the defect in close apposition to DBB particles. The bridging of newly formed bone takes place under the membrane surface in the outer layer of the defect. The newly formed trabeculae are covered by a periosteum-like tissue, with an outstanding vascular component. The intertrabecular space is filled with a primitive bone marrow. The former Haversian structures of DBB particles are occupied by vascular structures, and scattered osteoclasts can be seen in the biomaterial surface associated with osteoblast cells (Fig 4). The DBB lacunae are frequently occupied by osteocyte-like cells. Membrane thickness is observed to decrease, and it is vigorously colonized by capillars and fibroblasts. At the inner layer, over dura mater, bone formation is lesser and there is no bridging between the defect walls; furthermore, in this area, DBB particles are surrounded by vascularized stroma.

Beta-tricalcium phosphate sites: (Fig 2e) newly formed bone trabeculae bridge the defect walls with no differences between inner and outer layers. The BTCP particles are surrounded by woven bone linking particles. It seems that smoother surfaces tend to be more covered with bone while rougher zones seem to be more soluble and release more material particles. These material particles are frequently trapped by reticulo-endothelial system cells either placed on the material surface or in the adjacent soft tissue (Fig 5). The osteoblasts and osteocytes embedded into the bone matrix can be seen in close contact with the material surface. There is a periosteum-like layer that covers the new formed trabeculae underneath the membrane and over the dura mater. The

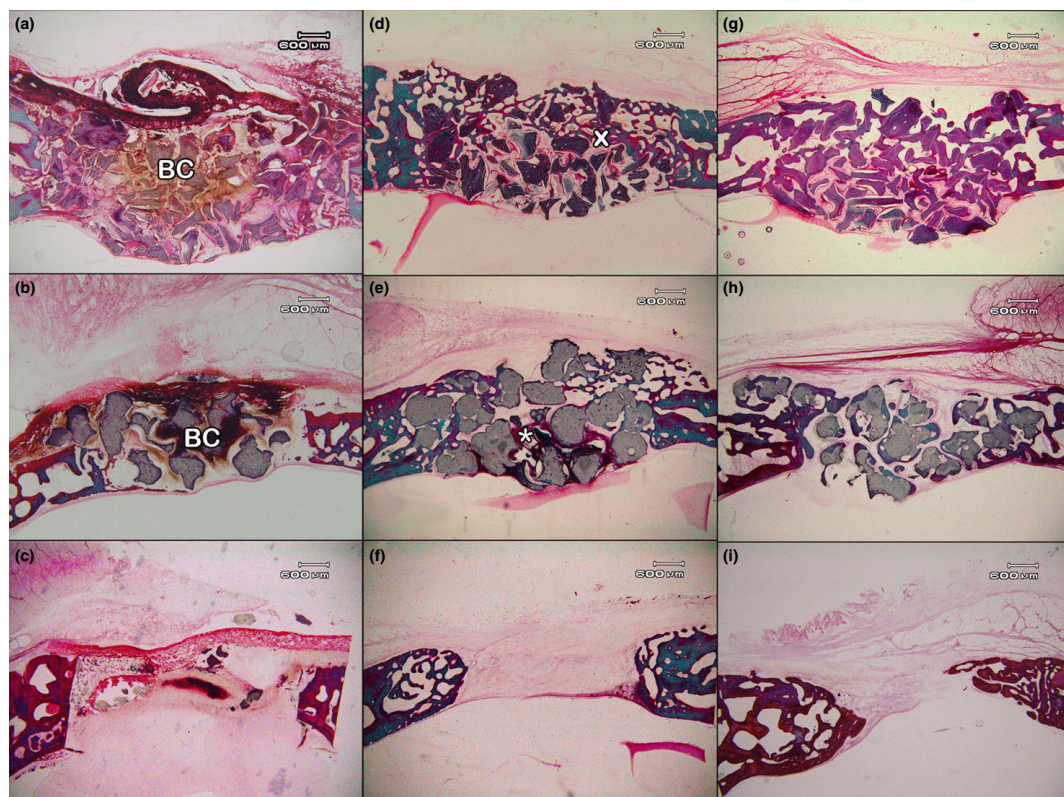


Fig. 2. Left column: Histological overview sections of defects after 1 week. [a] defect filled with deproteinized bovine bone (DBB); note the prevalence of the blood clot in the centre of the defect (BC). [b] void defect covered with membrane defect filled with beta-tricalcium phosphate (BTCP), note the fibrin and proteins surrounding the granules (detail in Fig 3b). [c] control, void defect covered with membrane. Middle column: Histological overview sections after 4 weeks. [d] DBB defect, note the woven bone reticulae formed linking the graft particles in the outer surface (cross). [e] BTCP defect, woven bone in the outer surface and granulation dense tissue in the centre and inner surface (asterisk). [f] control, the formation of woven bone starts on the walls of the defect. Right column: Histological overview sections after 8 weeks. [g] DBB defect, note the bone trabeculae bridging the defect in the outer zone, the DBB particles remain integrated in the bone structure. [h] BTCP, the woven bone trabeculae surround the remaining particulae that are resorbed. [i] control, note the formation of new bone mainly in the outer surface.

membrane is partially degraded as in DBB sites.

Control sites: (Fig 2f) the reparation of the defect starts in the base by forming a thin bone plate over the dura mater without bridging both walls. In the outer layer, there is a small formation in the tabula externa reparation. Membrane collapses in the vane that is now occupied by granulation tissue and mesenchymal stroma with small scattered nuclei of bone formation.

8 weeks

Deproteinized bovine bone sites: (Fig 2g) there is a whole trabecular bone, closing only the outer layer. Woven bone grows on the material surface linking the bone particles

within a network. The periosteum covers inner and outer bone. There is mature bone marrow beside the outer layer and mesenchymal stroma in the inner zone. The membrane was replaced by a fibrous dense layer in the galea aponeurotica.

Beta-tricalcium phosphate sites: woven trabecular bone grows mainly on the surface of the material particles, surrounding them all, and establishing a bridge both in the inner and in the outer zone. Bone marrow is similar to DBB sites.

Control sites: there is reparation of the defect in the outer and inner layer, periosteum is covering new bone over dura mater and underneath the fibrous band that has replaced the membrane, and under this

layer, there is a concavity of the newly formed bone and a thin layer of connective tissue.

16 weeks

Deproteinized bovine bone sites: (Fig 6a, Fig 7) images are similar to those taken after 8 weeks, evincing a greater consolidation of the outer bone bridge. Bone marrow is mature in the outer zone with abundant adipocytes. DBB particles are integrated into the new trabecular structure formed, and resorption is rare over their surface (Fig 7).

Beta-tricalcium phosphate sites: (Fig 6b) disaggregation and resorption of the material contained between trabeculae are very significant. Trabecular bone starts to be lamellar in

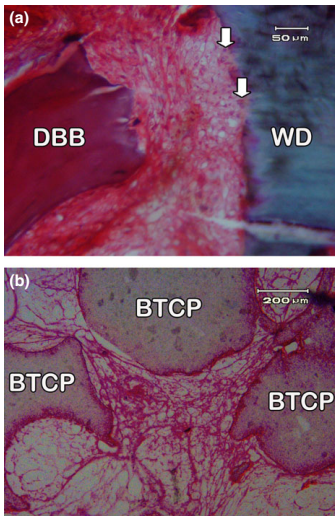


Fig. 3. One week details. (a) jumping space between deproteinized bovine bone surface and the wall defect (WD), notice the dense granulation tissue with abundant mitosis, (white arrows). (b) Beta-tricalcium phosphate particles at 1 week surrounded by protein network and prevascular structures.

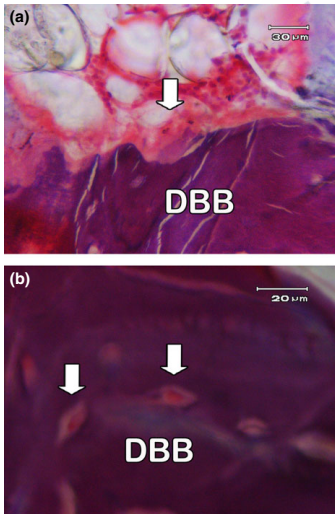


Fig. 4. Detail of deproteinized bovine bone (DBB) particles after 4 weeks. (a) osteoclastic-like activity in the surface of the particle (arrow). (b) DBB particle: former DBB lacunae occupied by osteocyte-like cells (arrows).

the inner layer and near the defect walls. There is complete bone bridging both in the inner and outer layer.

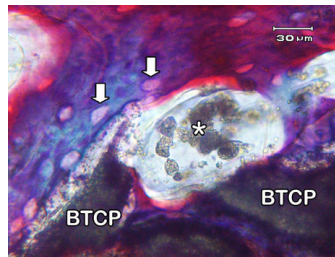


Fig. 5. Detail of beta-tricalcium phosphate particles in close contact with woven bone after 4 weeks. Observe the vehiculation of the granules of material captured by reticulo-endothelial system cells (asterisk). Osteocyte lacunae (arrows) can be observed in the newly formed bone trabeculae.

Control sites: (Fig 6c) a thin structure formed by an irregular tabula externa, small diploe and thin tabula interna bridges the defect walls. Bone trabeculae are formed by woven bone, and bone marrow is mature only in the proximity of the defect walls.

32 weeks

Deproteinized bovine bone sites: (Fig 6d) there is complete integration of the material, and a thin lamellar bone surrounds the remaining DBB particles bridging particles together, closing both the tabula externa and, more weakly, the tabula interna. Some remodelling basic multicellular units (BMU) could be observed in the new formed trabeculae. There is periosteum covering the ectocranium and the endocranium.

Beta-tricalcium phosphate sites: (Fig 6e) there is close apposition of woven bone on the particle surfaces. Those remaining areas of woven bone are surrounded by mature lamellar bone forming a thick trabecular network. Material disaggregation is still present, with material components in the bone marrow. There is no lack of continuity in any of the tabulae.

Control sites: (Fig 6f) there is a complete closure of the defect and there is a small concavity in the outer surface. Trabecular bone is almost completely lamellar with residual small areas of residual bone mainly in the inner closure.

52 weeks

Deproteinized bovine bone sites: (Fig 6g) very similar situation to 32nd week. The remaining DBB particles are integrated into a trabecular structure. Bone remodelling is mainly in the composite of bone and particles formed on the dura mater.

Beta-tricalcium phosphate sites: (Fig 6h) persistence of some thick woven bone areas; these structures are surrounding BTCP fragments showing an advanced resorption degree. The trabecular structure is formed by mature lamellar bone. Bone marrow is mature with great proportion of adipocytes.

Control sites: (Fig 6i) slight concavity on the tabula externa outer surface. The defect is completely closed. Trabecular structure is formed by mature lamellar bone, and bone marrow is mature with great proportion of adipocytes.

Morphometry

Kruskal-Wallis analysis shows significant differences for bone growth between BGS and control group within this study.

Longitudinal study

Bone: although a remarkable bone growth was observed between 1 and 4 weeks, even more intense in CTRL and BTCP sites, due to the great dispersion of the obtained data, these differences are not statistically significant. No significant increments of bone growth were observed, in consecutive periods, for any group. The first statistically significant difference is found for the bone growth between 1 and 16 weeks in the three groups. Mention should be made to the fact that this increase in the bone proportion for DBB sites grew from 23.9% (week 1) to 46.8% (week 16). Even though bone growth increased after the 16th week, this increment was not significant in DBB sites. In BTCP sites, there are significant differences between week 1 and week 16. Bone fraction in BTCP sites increased progressively from 24.9% (week 1) until it reached 63.2% in week 52 (Fig 9). All the obtained values, along with the average evolution curves, for the bone growth are depicted in Fig. 10. Note the different dispersion in the values exhibited by the three groups and its evolution within the time.

In sites filled with both BGS, bone fraction is bigger in the outer layer than in the inner layer, but it is significant in BTCP sites. In contrast, the control sites do not show differences between inner and outer layer. Bone fraction is also significantly larger in BTCP sites both for inner and outer layers (Fig 11).

Material: DBB exhibits a decrease: from week 8 (28%) to week 16 (23.3%) and from that moment on, there is no significant decrease in DBB presence. BTCP decreases significantly between week 1 (23%) and week

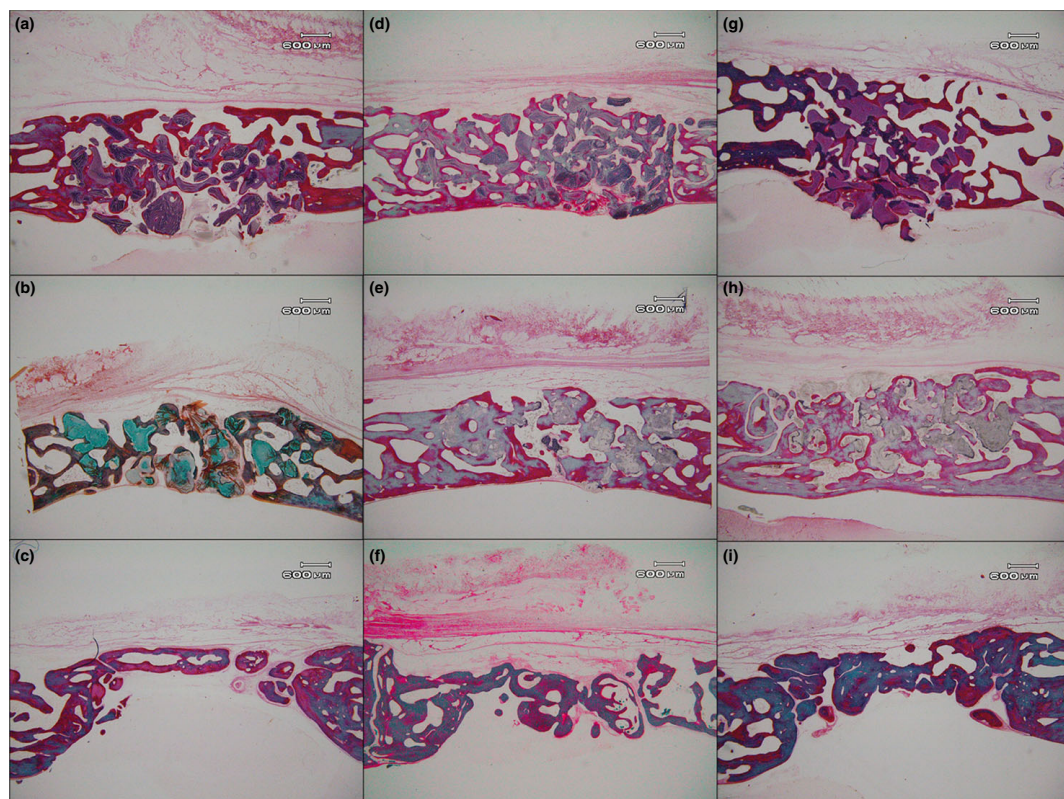


Fig. 6. Left column: Histological overview sections after 16 weeks. (a) Deproteinized bovine bone (DBB) defect, stronger consolidation in the outer zone and lower bone formation in the inner zone. (b) Beta-tricalcium phosphate (BTCP) defect, there is a quite complete bridging in the outer and in the inner layer. (c) control, observe the thin plate of new bone in the outer zone, collagen membrane is completely reabsorbed. Middle column: Histological overview sections at 32 weeks. (d) DBB defect, thin lamellar layer of new bone bridges the remaining DBB particles. (e) BTCP defect, particles appear to be quite reabsorbed. (f) control, closure of bone in the defect, there is a volumetric collapse. Right column: Histological overview sections at 52 weeks. (g) DBB defect, note the thin trabeculae surrounding the particles, and the lower integration in the material placed in the supra dura mater zone. (h) BTCP defect, note the close integration of the remaining material in the new formed trabecular structure. (i) control, closure of the defect, note the volumetric shrinkage.

16 (10%), slowing its resorption down in the following weeks (Fig 9).

Soft tissue: a ca. 20% significant reduction in soft tissue appears in every site from week 1 to week 4, which could be attributed to the reduction in postoperative oedema and to the organization of the wounded sites that underwent an initial shrinking.

Transversal study

Bone: bone fraction becomes significantly larger after week 32 in BTCP sites (61.6%) when compared to DBB sites (44%) and to the control sites (53%), there is a borderline signification ($P = 0.06$). Bone fraction in DBB sites exhibits smaller standard deviation than BTCP sites or control sites within the

duration of this study (Fig 10). It is also worth to mention that the deviation of the data gets reduced within the time.

Material: after week 16, BTCP proportion (10%) becomes smaller than DBB proportion (20%), and this difference lasts until week 52.

Soft tissue: in sites filled with BGS, the smaller proportion of soft tissue becomes significant after week 4, due to the sum of BGS and new bone (mineralized area) in contrast to the absence of BGS in the control sites. The lowest values for soft tissue after week 8 are found in BTCP sites (28.1–33.4%) with no significant difference to DBB sites (30.7–35.5%).

In the sight of the findings above described, both hypotheses are rejected.

Discussion

This study shows that bone growth pattern is different for both BGS. Bone formation is faster in places grafted with DBB, where bone fraction is significantly smaller in the long term compared to BTCP sites and also than in control sites. The sites grafted with BTCP exhibit faster rebuilding of endocranial layer that sites grafted with DBB. Bone growth is faster in the outer layer than in the inner layer for both materials.

In BTCP sites, bone fraction is significantly larger than bone fraction grown around DBB. This is in agreement with previous reports (Buser et al. 1998; Artzi et al. 2004; Jensen et al. 2006) and introduces the suspicion that

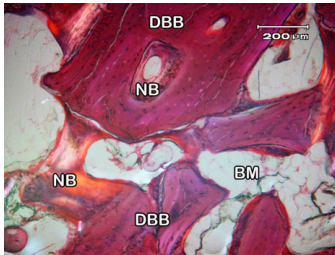


Fig. 7. Defect filled with deproteinized bovine bone (DBB) after 16 weeks. Polarized light allows to distinguish the graft remaining particles to the thin surrounding new formed trabeculae (orange colour NB). Few trabeculae presented parallel-fibred structure. The main part of new bone is woven structured. Haversian-like structures of new bone grow inside the old DBB vascular structures. Mature bone marrow (BM) can be observed between the bone and the particle structure.

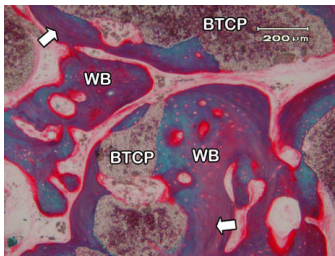


Fig. 8. Newly formed bone surrounding the remaining β -tricalcium phosphate particles after 16 weeks, a close interface is developed; notice the osteoblastic activity in the purple border surrounding the bone trabeculae. Parallel fibred bone (arrows) starts to develop near the predominant woven bone (WB).

bone formation is intimately related to the degradation of BTCP particles [Samavedi et al. 2013]. This bone formation takes place while those particles are still present [Cheng et al. 2013] and this bone fraction being even larger than in the control sites. As a consequence of the coexistence of BGS and bone fraction, these sites exhibit a significantly smaller fraction of soft tissue [Artzi et al. 2004; Jensen et al. 2006]. The increment of the mineralized areas in BTCP sites would reinforce the hypothesis that BTCP acts positively over osteoblastic activity [Knabe et al. 2000; Dalcusi et al. 2003; Cheng et al. 2013; Samavedi et al. 2013]. Unlike in DBB sites, the bone growth in areas next to dura mater takes place at early stages in BTCP sites. It is worth to highlight that in this work, we have observed that early bone formation in DBB sites takes place only under collagen

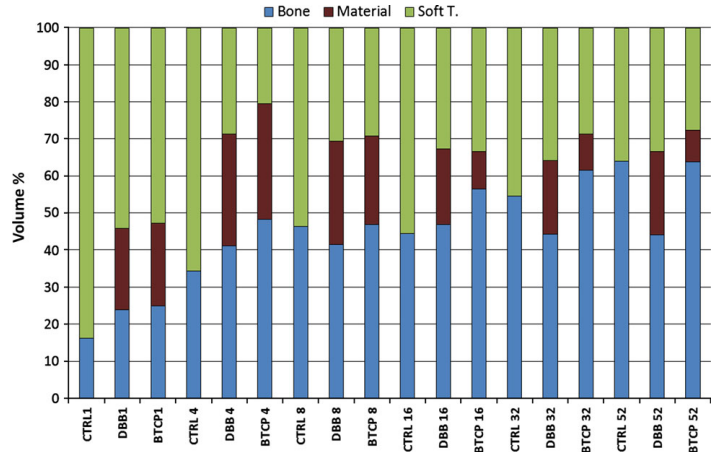


Fig. 9. Histomorphometrical study of the mean volume fractions of bone, grafting material and soft tissue occupying the defects: from 1 week to 52 weeks. CTRL: control, DBB: deproteinized bovine bone, BTCP: beta-tricalcium phosphate.

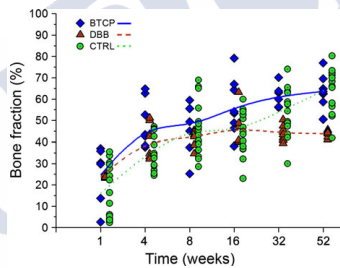


Fig. 10. Scattered plot graphic representation for the whole data of the bone fraction for beta-tricalcium phosphate (BTCP), deproteinized bovine bone (DBB) and control (CTRL) sites vs. time. The mean variations are represented by the lines [BTCP: continuous line, DBB: dashed line and CTRL: dotted line].

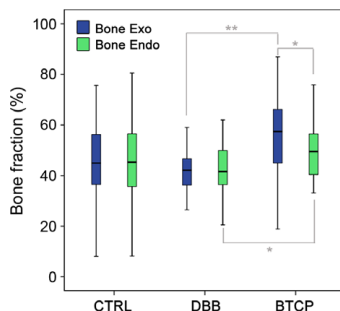


Fig. 11. Box and whisker plots for bone growth in the outer zone [Bone Exo] vs. the inner zone [Bone Endo] for the three sites. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$.

membrane at the outer layer, and bone growth at the inner layer takes place in a later period, being the bone growth at last term the same in both layers. No presence of fibrous growth has been detected around DBB particles which are not covered by collagen membrane and are not involved in the bone growth [Donos et al. 2004]. Previous works refer to the positive interaction of collagen membrane over bone growth [Wang et al. 2002; von Arx et al. 2005] which would act, mainly at early stages, as an osteopromotive agent [Tarnow et al. 2000; Artzi et al. 2004], by transforming undifferentiated stroma into osteogenous tissue and therefore promoting cellular migration [Taguchi et al. 2004]. The action of membrane as a booster of the bone growth is inferred by the complete closing of the defect in control sites. Even though there is a partial collapse of the collagen membrane [Hammerle & Jung 2003], it induces reparation of the bone network in the submembrane gap and, for some authors, it is the principal element in the defect bone healing [Donos et al. 2004]. The absence of BGS to prevent membrane collapse ends in an incomplete restoration of the bone volume, being detectable a concavity in the outer layer (Fig 6i) [Hammerle et al. 1998; von Arx et al. 2005; Artzi et al. 2004] and, as presented in this work, volumetric restorations not *ad integrum*.

Bone growth around DBB particles seems to be more regular and homogeneous, exhibiting smaller standard deviations in the

measurements than BTCP. It is worthwhile pointing out that rapid bone growth rates measured in DBB sites get stabilized after week 8. From that moment on, bone maturation processes and qualitative changes in the organization of the trabecular network take place, but not any significant increase in bone fraction. Both BGS exhibit a different bone growth pattern. DBB eases bone growth, creating a bone network around particles. In the long term, there are DBB particles linked by lamellar bone (Piatelli et al. 1999; Jensen et al. 2006). As previously stated by Jensen et al. (2005), the presence of bovine bone particles reduces bone growth when this DBB-bone composite material is created (Donos et al. 2004). Due to their micro-architecture, DBB particles are completely integrated into bone matrix, becoming part of the intrinsic neo formed trabecular structure. As our work has shown, their role is not completely passive, because in the periferic osteocitarian lacunae of DBB, there is colonization by host cell with morphology similar to osteocytes (Piatelli et al. 1999; Martinez et al. 2010). Vascular structures are frequently observed to colonize Havers channels found in DBB particles. Therefore, DBB particles could have become integrated as an active part of the mecano-receptor system of host's bone integrated by osteocytes (Turner 2004). The low resorption of DBB particles after 16 week supports such possibility. There is a preliminary stage where there are erosion processes over DBB particles, with the presence of resorptive cells (Fig 4a); this process has been defined as an initial cleaning of the graft surface before a bone deposition process (Piatelli et al. 1999; Jensen et al. 2006); however, after this initial cleaning, DBB particles remain as a not resorbed element which maintains bone fraction below the values exhibited by control group, giving the impression that contains bone formation.

Long-lasting presence of DBB particles in neo formed bone, even though preserve the initial volume, also has the capability of blocking the bone remodelling process, as it has already pointed out (Araujo et al. 2011). In the present work, the impairing of block remodelling in the long term can be seen in the protrusion of the inner tabula in the encephalic cavity (Fig 6a,g). Resorption zones or bone remodelling areas are hardly attested in DBB sites in the long term.

BTCP exhibits a completely different pattern for bone growth. Even though we have employed a low resorption BTCP in this study (Ghanaati et al. 2010), material disintegration has been observed. According to the

literature, BTCP degradation occurs due to the activity of reticulo-endothelial system (RES) and material disintegration itself (Fig 5) (Yamada et al. 1997; Artzi et al. 2004; von Doenrberg et al. 2006; Jensen et al. 2006). There are parts of the material which are presumably more stable due to a better crystallization within sintering process. Such areas possess a suitable microporosity, and bone matrix is easily attached to their surface (Martinez et al. 2010). Other areas in the particles exhibit fracture surfaces due to fabrication process and result more soluble. This vehiculation of the material makes that the bone in direct contact with BTCP be mainly woven bone. It becomes completely a mature bone when BTCP fraction is smaller than 10% volume and the material disaggregation stabilizes (week 32). Bone remodelling and BMU presence are more evident in BTCP sites than in DBB ones. Quite likely, BTCP will be completely resorbed (Artzi et al. 2004), and bone will be completely remodelled when considering longer periods (Bain & Gross 2005). Besides, it is remarkable that the low solubility exhibited by the employed BTCP in this work, compared to other reported results (Artzi et al. 2004), which favours the establishment of fairly stable interfaces (Fig. 8). BTCP exhibits a high capability to stimulate bone formation, having even a higher bone fraction of the mineralized area than control sites. As already shown in this study, this capability promotes the bone formation both in the outer layer (under the membrane) and in the inner layer (over dura mater), allowing the complete closure of inner and outer cortical tabula sooner than in other sites. In the present work, BTCP shows a great osteogenic capability for new bone formation, even in those areas with lower osteogenic potential.

Due to the subcritical size, the model followed in our work allows a complete closure of the defects within the examined time (Hollinger & Kleinschmidt 1990). The removal of the inner cortical layer, exposing the dura mater membrane, creates a defect that provides osteogenic supply only from lateral walls, resulting equivalent to a two defect walls. Covering the defect with collagen, the membrane eases the defect closure (von Arx et al. 2005) allowing to make a comparison of osteogenic activity under the collagen membrane vs. inner layer over dura mater. One pole of the defect is under the collagen membrane which acts as a bridge favouring the jump of osteoprogenitor cells from bone walls, whereas the other pole is only limited by dura mater and encephalic membranes. Even

though the collagen membrane lasts for only 4 and 8 weeks, it exhibit an early activity which conditions the defect bone healing (Wang et al. 2002; Artzi et al. 2004; von Arx et al. 2005). This seems to be a definitive element for bone regeneration. However, the relevant role played by the collagen membrane is possibly conditioned by many other factors, not fully clarified, for example the nature of the employed BGS. BTCP is less sensitive to coverage with collagen membrane (Schulten et al. 2013). It is worth remarking that the bone metabolism in the rabbits is faster than in humans (Pearce et al. 2007), so the timeline described in this work will probably be longer when grafting in human bone, which reinforces the importance of this long-term studies in animals.

Bearing in mind the limitations of the present study, more precisely the reduced size of the sample, it is noteworthy that the response trends exhibited by these BGS are different along the time.

Conclusions

Collagen membrane plays an important role in the defect bone healing because bone growth occurs earlier in the layer covered by a membrane. However, the nature of the graft substitute also plays a relevant role in the amount of bone formed. Bone growth is significantly faster in DBB sites, but, in opposition to BTCP sites, the presence of the DBB remnant particles seems to diminish the bone fraction in the long term. In the defect sites grafted with BTCP, more bone was observed in comparison with DBB site, and endocranial layer is restored faster.

Acknowledgements: The authors wish to thank Dr Jaime Franco for his outstanding assessment and advice in the characterization and properties of the BGS. We are also grateful to Mr. Ruben Corral for his valuable assistance preparing the histologic sections and the two anonymous reviewers which have enriched this manuscript with their valuable comments and advice. The study was supported by grants from the Regional Government of Galicia (Xunta de Galicia PGIDT09TMT003239PR) and the Spanish Government (CENT INTELIMPLANT, CDTI). None of the authors have any financial or commercial interest in any of the investigated biomaterials or products employed in this study.

References

- Albert, A., Leemrijse, T., Druet, V., Delloye, C. & Cornu, O. (2006) Are bone autografts still necessary in 2006? A three-year retrospective study of bone grafting. *Acta Orthopaedica Belgica* **72**: 734–740.
- Araujo, M.G., Linder, E. & Lindhe, J. (2011) Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **22**: 1–8.
- Artzi, Z., Weinreb, M., Carmeli, G., Lev-Dor, R., Dard, M. & Nemcovsky, C.E. (2008) Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **19**: 686–692.
- Artzi, Z., Weinreb, M., Givol, N., Rohrer, M.D., Nemcovsky, C.E., Prasad, H.S. & Tal, H. (2004) Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19**: 357–368.
- von Arx, T., Brogini, N., Jensen, S.S., Bornstein, M.M., Schenk, R.K. & Buser, D. (2005) Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in rabbit calvarium. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **20**: 843–853.
- Bain, S.D. & Gross, T.S. (2005) Structural aspects of bone resorption. In: Bronner, F., Frach-Carson, M.C. & Rubin, J., eds. *Bone Resorption*, 58–66. London: Springer-Verlag.
- Bayley, R.C. & Byrnes, J. (1990) A new, old method for assessing measurement error in both univariate and multivariate morphometric studies. *Systematic Zoology*, **39**: 124–130.
- Benezra Rosen, V., Hobbs, L.W. & Spector, M. (2002) The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxyapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials* **23**: 921–928.
- Berglundh, T. & Lindhe, J. (1997) Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **8**: 117–124.
- Busenlechner, D., Tangl, S., Mair, B., Fugger, G., Gruber, R., Redl, H. & Watzek, G. (2008) Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. *Biomaterials* **29**: 3195–3200.
- Buser, D., Hoffmann, B., Bernard, J.P., Lussi, A., Mettler, D. & Schenk, R.K. (1998) Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **9**: 137–150.
- Chen, F.M., Zhang, J., Zhang, M., An, Y., Chen, F. & Wu, Z.F. (2010) A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials* **31**: 7892–7927.
- Cheng, L., Shi, Y., Ye, F. & Bu, H. (2013) Osteoinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. *Materials Science and Engineering: C* **33**: 1254–1260.
- Dalcusi, G., Laboux, O., Malard, O. & Weiss, P. (2003) Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**: 195–200.
- von Doenrborg, M.C., von Rechenberg, B., Böhner, M., Grünfelder, S., van Lenthe, G.H., Mueller, R., Gasser, B., Mathys, R., Baroud, G. & Auer, J. (2006) In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* **27**: 5186–5198.
- Donath, K. & Breuner, G.A. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* **11**: 318–326.
- Donos, N., Lang, N.P., Karoussis, I.K., Bosshardt, D., Tonetti, M. & Kostopoulos, L. (2004) Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical size defects. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **15**: 101–111.
- Ghanaati, S., Barbeck, M., Orth, C., Willemschäusen, L., Thimm, B.W., Hoffmann, C., Rasic, A., Sader, R., Unger, R.E. & Peters, F. (2010) Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomaterialia* **6**: 4476–4487.
- Guizzardi, S., Raspanti, M., Martini, D., Scandroglio, R., Govoni, P. & Ruggeri, A. (1995) Low-temperature heat-deproteinized compact bone to heal large bone defects. *Biomaterials* **16**: 931–936.
- Haas, R., Mailath, G., Dörbuda, O. & Watzek, G. (1998) Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus augmentation: analysis of interfacial bond strength of dental implants using pull-out tests. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **9**: 117–122.
- Hämmerle, C.H., Chiantella, G.C., Karring, T. & Lang, N.P. (1998) The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **9**: 151–162.
- Hammerle, C.H. & Jung, R.E. (2003) Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontology* **2000** **33**: 36–53.
- Hollinger, J.O. & Kleinschmidt, J.C. (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery* **1**: 60–68.
- Jensen, S.S., Brogini, N., Hjørting-Hansen, E., Schenk, R. & Buser, D. (2006) Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **17**: 237–243.
- Jensen, S.S., Brogini, N., Weibich, G., Hjørting-Hansen, E., Schenk, R. & Buser, D. (2005) Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **20**: 703–712.
- Johanson, B., Grepe, A., Wannfors, K. & Hirsch, J.M. (2001) A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofacial Radiology* **30**: 157–161.
- Klijn, R.J., Meijer, G.J., Bronkhorst, E.M. & Jansen, J.A. (2010) A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time for various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. *Tissue Engineering Part B Reviews* **16**: 493–507.
- Knabe, C., Driessens, F.C., Planell, J.A., Gildenhaar, R., Berger, G., Reif, D., Fitzner, R., Radlanski, R.J. & Gross, U. (2000) Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *Journal of Biomedical Materials Research* **52**: 498–508.
- Lekholm, U., Ericsson, I., Adell, R. & Slots, J. (1986) The condition of the soft tissues at tooth and fixture abutments supporting fixed bridges. *Journal of Clinical Periodontology* **13**: 558–562.
- Martinez, A., Franco, J., Saiz, E. & Guitian, F. (2010) Maxillary sinus floor augmentation on humans: packing simulations and 8 months histomorphometric comparative study of anorganic bone matrix and B-talcium phosphate particles as grafting material. *Materials Science and Engineering: C* **30**: 763–769.
- Misch, C.E. & Dietsch, F. (1994) Endosteal implants and iliac crest grafts to restore severely resorbed totally edentulous maxillae. A retrospective study. *Journal of Oral Implantology* **20**: 100–110.
- Orr, T.E., Villars, P.A., Mitchell, S.L., Hsu, H.-P. & Spector, M. (2001) Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials* **22**: 1953–1959.
- Pearce, A.I., Richards, R.G., Milz, S., Schneider, E. & Pearce, S.G. (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European Cells and Materials* **13**: 1–10.
- Piatelli, M., Favero, G.A., Scarano, A., Orsini, G. & Piatelli, A. (1999) Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **14**: 835–840.
- Rasband, W.S. (2012) ImageJ. U. S. National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012.
- Samavedi, S., Whittington, A.R. & Goldstein, A.S. (2013) Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia* **9**: 8037–8045.
- Schmitt, C., Karasholi, T., Lutz, R., Wiltfang, J., Neukam, F.W. & Schlegel, K.A. (2012) Long-term changes in graft height after maxillary sinus augmentation, only bone grafting, and combination of both techniques: a long-term retrospective cohort study. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **25**: 38–46.
- Schlegel, K.A., Fichtner, G., Schultze-Mosgau, S. & Wiltfang, J. (2003) Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a

- bovine bone substitute. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **18**: 53–58.
- Schulten, E.A.J.M., Prins, H.J., Overman, J.R., Helder, M.N., Bruggenkatte, C.M. & Klein-Nulend, J. (2013) A novel approach revealing the effect of a collagenous membrane on osteoconduction in maxillary sinus floor elevation with β -Tricalcium Phosphate. *European Cells and Materials* **25**: 215–228.
- Taguchi, Y., Amizuka, N., Nakadate, M., Ohnishi, H., Fujii, N., Oda, K., Nomura, S. & Maeda, T. (2004) A histological evaluation for guided bone regeneration induced by collagenous membrane. *Biomaterials* **26**: 6158–6166.
- Tamow, D.P., Wallace, S.S., Froum, S.J., Rhorer, M.D. & Cho, S.-C. (2000) Histologic and clinical comparison of bilateral sinus floor elevations with and without barrier membrane placement in 12 patients: part 3 of an ongoing prospective study. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **20**: 116–125.
- Turner, C.H. (2004) Biomechanical aspects of bone formation. In: Bronner, F. & Farach-Carson, M.C., eds. *Bone Formation*, 79–105. London: Springer-Verlag.
- Wang, H.L., Miyauchi, M. & Tanaka, T. (2002) Initial attachments of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an *in vitro* study. *Journal of Periodontal Research* **37**: 340–344.
- Yamada, S., Heymann, D., Bouler, J.M. & Dalcusi, G. (1997) Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* **18**: 1037–1041.



INTRODUCTION & PURPOSE

β -tricalcium phosphate (β -TCP) is one of the most employed synthetic bone substitutes in oral surgery for alveolar preservation and guided bone regeneration. β -TCP possesses similar stoichiometry than bone, given that its Ca/P ratio is 1.5. It is a biocompatible, bioactive, osteoconductive and osteoinductive material, and it resorbs faster than α and γ TCP forms, and hydroxyapatite (1). In addition to physicochemical properties, the macro and microstructural properties affect the material biological activity, determining bone growth and material resorption. Microporosity intervenes in protein adsorption and retention; and macroporosity and its interconnection play a role in cell adhesion and migration, as well as in the supply of nutrients. Although porosity decreases the material's mechanical properties, it is needed for bone ingrowth; the recommended minimum pore size to produce osteogenesis is 100 μ m. With smaller pores, chondrogenesis occurs prior to osteogenesis (2). Another factors that also affect bone ingrowth are pore distribution and morphology (3).

The aim of this study was to compare bone response when granulates of β -TCP with different porosities and microstructures are employed.

MATERIALS & METHODS

1. Material fabrication/characterization

Dense β -TCP granulate was fabricated from high purity ($\geq 99\%$) β -TCP powder (Fig 1) calcined at 800 °C. Dense pieces ($3.05 \text{ g/cm}^3 \pm 0.01$, 99.3% theoretical density) were made by cold isostatic pressing followed by sintering at 1125 °C for 3 hours. Pieces were milled and sieved to obtain dense granulates with grain size between 0.25-1 mm (Fig 2.a), Porosity= $0.6\% \pm 0.3$, Surface Area= $0.01 \text{ m}^2/\text{g}$ (Fig 2.b)



Fig 2.a.

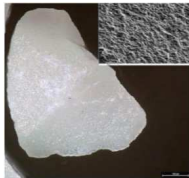


Fig 2.b.

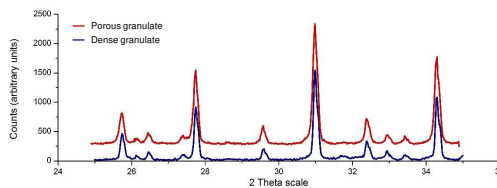


Fig 1: X-ray diffraction patterns of powders obtained from dense granulate and porous granulate (KeraOs®). The characteristic peaks of β -TCP can be observed.

Porous β -TCP granulate (KeraOs, Keramat S.L., Spain) was characterized. Purity $\geq 99\%$ (Fig 1), Grain Size= $0.25\text{-}1 \text{ mm}$ (Fig 3.a), Porosity= $23.8\% \pm 1.9$ (Fig 4), Surface Area= $0.28 \text{ m}^2/\text{g}$ (Fig 3.b)

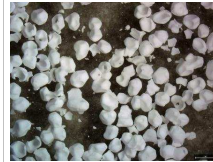


Fig 3.a.

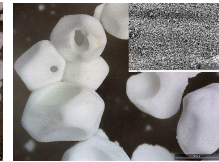


Fig 3.b.

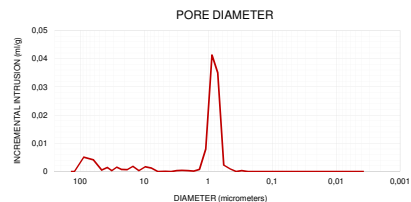


Fig 4: Porous β -TCP granulate presents a bimodal distribution of porosity. Due to the sintering process, microporosity (0.9 μ m in diameter) is the most relevant characteristic.

2. Surgical procedure



Fig 5

- Four circular non-critical size defects 7 mm in diameter were prepared in three New Zealand rabbits' cranial vaults (Fig 5)
- One defect was filled with dense β -TCP granulate (dense group), another defect was filled with porous β -TCP granulate (porous group), the remaining two defects were not filled (control group)
- All the defects were covered with a collagen membrane (Bio-Gide 25x25 mm, Geistlich, Switzerland). The periosteum, galea aponeurotica and skin were sutured in layered closure with discontinuous monofilament reabsorbable sutures (Fig 6)



Fig 6

3. Data analysis

After 16 weeks, rabbits were sacrificed and histological and morphometric analysis of the amount of bone and material in each group were performed using Image J and SPSS 20.1 softwares. Kolmogorov-Smirnov, one-way ANOVA and Bonferroni post hoc tests were employed.

RESULTS & DISCUSSION

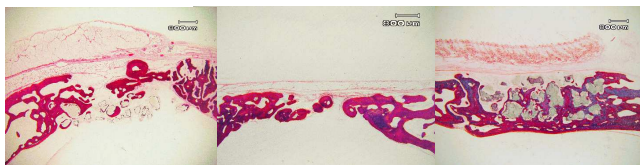


Fig 7.a

Fig 7.b

Fig 7.c

Figs 7.a, 7.b and 7.c:

- In dense and porous groups there is direct bone apposition on the material. No inflammatory reactions, fibrosis, or material encapsulation are observed; in contrast to the reported when hydroxyapatite dense particles were employed (4)
- In the porous group, there is a significantly greater amount of new bone formed, and additionally there is bone growth inside pores (Fig 8). This fact indicates that the material acts as a scaffold of bone ingrowth, facilitating cell migration and angiogenesis. In contrast, in dense group, there is no bone formation inside granules, as the new bone bridges and surrounds the particles. (Fig 9)
- The amount of new bone formed 16 weeks after its implantation in the presence of dense β -TCP is similar to that obtained with porous β -TCP after 4-8 weeks; according to data reported by Martínez et al. (2015) (5)
- Differences in remaining material after 16 weeks were not significant between porous (10.19%) and dense (10.78%) groups. This would indicate that the material solubility and bioactivity depends more on the material chemical composition than on material porosity. However, this result differs from the data obtained in *in vitro* studies performed by us and the data published in previous articles (6).

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Ogata, A., Hotta, T., Kawashima, H., Kondo, N., Gu, W., Kamura, T., & Endo, N. (2005). Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 75(1), 94-101.
2. Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491.
3. Patel, N. A., & Mastror, G. (2014). Role of pore size and morphology in muscle-related tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 922-939.
4. Kuboki, Y., Takita, H., Kobayashi, D., Tsuruga, E., Inoue, M., Murata, M., & Ohtsuka, H. (1998). BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and favorable structure. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 39(2), 189-199.
5. Martínez, A., Barboza, O., Gasamán, I., Otero-Capedia, X. L., & Guitián, F. (2015). Deproteinized bovine bone vs. beta tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. *Clinical and experimental research*, 38(6), 623-630.
6. von Dörmberg, M. C., von Ruchenberg, B., Böhmer, M., Grünfelder, S., van Lierde, G. H., Möller, R., & Auer, J. (2006). *In vivo* behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*, 27(30), 5188-5196.

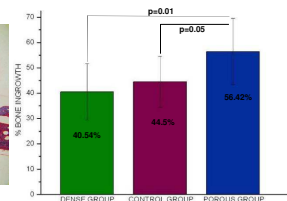


Fig 10: Bone ingrowth was higher in the porous group than in control and dense groups. The difference in bone formation between porous and control groups was statistically different ($p=0.05$) and the significance was higher between porous and dense groups ($p=0.01$). But it is important to remark that there were no differences in bone growth proportion between holes filled with dense β -TCP and control holes. Following this results, the use of very dense β -TCP material apparently does not improve new bone formation.

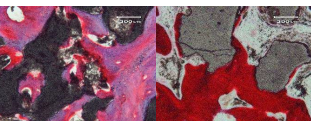


Fig 8

Fig 9



INTRODUCTION & PURPOSE

Hydroxyapatite (HA) is one of the most employed bone substitutes in oral surgery for alveolar preservation and guided bone regeneration along with β-TCP. Bio-Oss® is an alloplastic graft of deproteinized bovine bone whose main component is HA. Its nanostructured surface provides osteoinductive properties acting as scaffold for osteogenic precursor cells during bone healing. However, it lacks osteoclastic and osteogenic properties. Bone's resorption ratio is very low, so its remains in the host tissue for a long time [Trapiakowski et al., 2018].

In addition to physicochemical properties, the macro and microstructural parameters are important factors determining bone growth and material resorption. Macroporosity intervenes in protein adsorption and retention; and macropores play a role in the migration of nutrients. The recommended minimum pore size to produce osteogenesis is 100 µm. With smaller pores, chondrogenesis occurs prior to osteogenesis [Kargnapourou et al., 2005]. Other factors that affect bone ingrowth are pore distribution and morphology [Pelez et Mestres, 2016].

MATERIALS & METHODS

1. Material fabrication/characterization

Dense HA granulate was fabricated from high purity HA powder calcined at 900 °C. Dense pieces (3.1 g/cm³±0.01, 99.4% theoretical density) were made by cold isostatic pressing, followed by sintering at 1200 °C for 2 hours. Pieces were milled and sieved to obtain dense granulates.

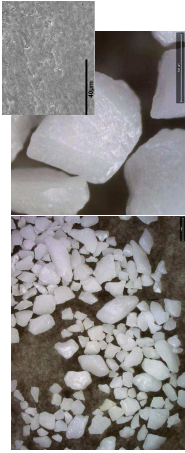


Fig 2.a.

Fig. 1: X-ray diffraction patterns obtained from dense granulate and porous granulate (Bio-Oss®). The characteristic peaks of hydroxyapatite can be observed. Bio-Oss® shows lower crystallization because it is a natural apatite that is not subjected to thermal treatment for sintering.

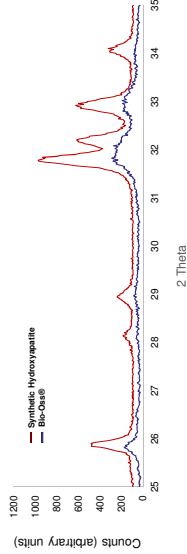


Fig 2.b.

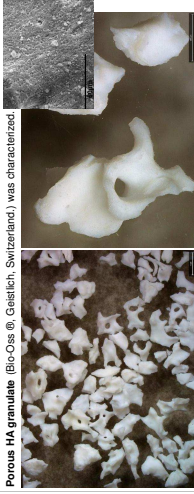


Fig 3.b.

Fig 3.8.

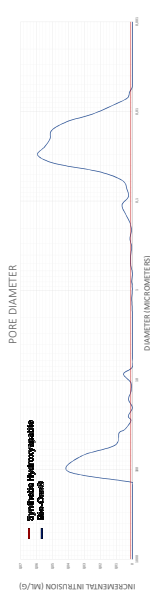


Fig 4: Bio-Oss® porosity presents a bimodal distribution. Microporosity between 0.01 and 0.1 μm represents the 71.5%, this is due to the lacunae and Haversian Canals. Microporosity between 150 and 500 (16.3%) is due to the trabecular spaces and the remanent spaces between particles. Dense HA does not present porosity.

2. Surgical procedure

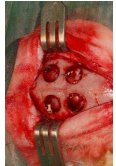


Fig 5

3. Data analysis

After 16 weeks, rabbits v

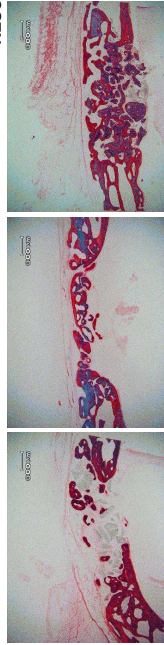


Fig 7.a

Fig 7.a

In dense and porous groups there is direct bone apposition on the material. No inflammatory reaction, fibrinolysis, or material encapsulation are observed. In contrast to those reported when hydroxyapatite dense particles were employed, by Kubota et al. (1988) in the porous group, there is a significantly greater amount of new bone formed, and additionally there are blood vessels inside pores (Fig. 8). This fact indicates that the material acts as a scaffold for bone ingrowth, facilitating cell migration and angiogenesis. In contrast, in the dense group there is no bone formation inside granules, the new bone is formed only on the surface of the particles.

The amount of new bone formed 16 weeks after its implantation in the presence of dense HA is less than that obtained employing porous HA after 8 weeks, according to data reported by Martínez et al. (2015).

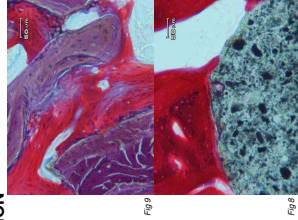


Fig 1

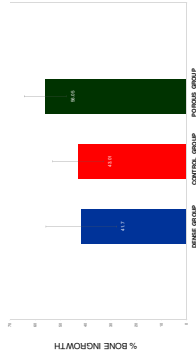


Fig. 10: Bone ingrowth was higher in the porous group than in control and dense groups. The differences in bone formation between porous and control groups and between porous and dense groups were statistically significant ($p=0.01$). But it is important to remark that there were no differences in bone growth proportion between holes filled with dense HA and control holes ($p=1.00$). Following this results, the use of very dense HA material apparently does not improve new bone formation.

RESULTS & DISCUSSION

all post hoc tests were employed.



503

- Four circular non-critical size defects 7 mm in diameter were prepared in three New Zealand rabbits' cranial vaults (Fig. 5).
- One defect was filled with dense HA granulate (dense group), the remaining two defects were not filled (control group).
- At the defects were covered with a collagen membrane (Bio-Coder, 25x25 mm, Gestich, Switzerland). The perosteum, galea aponeurotica and skin were sutured in layered closure with

